

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-OHREN-HEILKUNDE
PROF. DR. MED. JÜRGEN STRUTZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ALTERSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DES COLLICULUS INFERIOR
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES NEUROTRANSMITTERS GABA
BEI DER MONGOLISCHEN WÜSTENRENNMAUS (*MERIONES UNGUICULATUS*)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Netz

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-OHREN-HEILKUNDE
PROF. DR. MED. JÜRGEN STRUTZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ALTERSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DES COLLICULUS INFERIOR
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES NEUROTRANSMITTERS GABA
BEI DER MONGOLISCHEN WÜSTENRENNMAUS (*MERIONES UNGUICULATUS*)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Judith Netz

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Otto Gleich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Strauß

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1 Die Verwendung der Mongolischen Wüstenrennmaus als Versuchstier in der Hörforschung	9
2.2 Herstellung der histologischen Schnitte	10
2.3 Auswahl der zu untersuchenden Schnitte	13
2.4 Aufnahme und Digitalisierung der ausgewählten Schnitte	15
2.5 Weitere Bildverarbeitung am PC	15
2.6 Vermessung des Colliculus inferior und Zählung der GABAergen Neurone	16
2.7 Zellvermessung zur Prüfung möglicher tonotoper Gradienten	21
2.8 Graphische Darstellung und statistische Analyse	23
3. Ergebnisse	26
3.1 Analyse möglicher Alterseffekte	26
3.1.1 Querschnittsfläche, Breite und Höhe des IC	26
3.1.2 Anzahl GABAerger Neurone	29
3.1.3 Dichte GABAerger Neurone	31
3.1.4 Detaillierte Analyse einzelner Zellen (mittlere Querschnittsfläche GABAerger Neurone, mittlerer Grauwert des Neuropils, mittlerer Grauwert der Zellen)	33
3.2 Gradienten entlang der dorsoventralen Achse des IC	41
3.2.1 Zell-Querschnittsflächen	41
3.2.2 Grauwerte GABAerger Zellen	44
3.3 Auswirkung von Schädigungen des Mittelohrs und des Gehörgangs auf die lokale Dichte GABAerger Zellen im IC	47
4. Diskussion	55
4.1 In bisherigen Arbeiten beschriebene Effekte des Alterns auf die Hörbahn	55
4.2 Anzahl und Dichte GABAerger Neurone im IC von Wüstenrennmäusen und Ratten - Anlass für einen Vergleich peripheren Hörvermögens der beiden Versuchstiere im Alter	56
4.3 Altersbedingte Veränderungen der Querschnittsfläche des IC und anderer Kerngebiete der Hörbahn	60
4.4 Die Verteilung GABAerger Neurone im IC und dessen tonotope Gliederung	62

4.5	Die Folgen uni- und bilateraler peripherer Hörschädigungen auf den GABA-Stoffwechsel in der zentralen Hörbahn - Rückschlüsse auf mögliche Auswirkungen altersbedingter Schwerhörigkeit auf den IC.....	65
5.	Zusammenfassung.....	70
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Anhang.....	80
7.1	Tabellenverzeichnis	80
7.2	Abkürzungsverzeichnis	87
7.3	Danksagung.....	88

1. Einleitung

Macht man sich die grundlegende Bedeutung des Hörens für die alltägliche Lebensorganisation und den Zugang zum sozialen Umfeld bewusst und betrachtet dann die Zahlen hörgeschädigter Menschen in den verschiedenen Altersklassen, so wird einem die Brisanz des Themas „Altersschwerhörigkeit“ (Presbyakusis) deutlich vor Augen geführt. Nach einer Studie von Sohn (2000) sind in Deutschland im vierten Lebensjahrzehnt 6 % der Bevölkerung von einer Hörschädigung betroffen, im fünften Lebensjahrzehnt bereits ein Viertel und ab 70 Jahren haben 54 % der Bevölkerung ein beeinträchtigtes Hörvermögen (**Abb. 1.1**). Neuere Untersuchungen belegen, dass bei älteren Menschen der Anteil der Normalhörigen noch weiter abnimmt (12 % bei den 71-80 Jährigen, 2 % bei den über 80 Jährigen). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Hörminderung in höheren Lebensjahren in den letzten Jahren besonders die für die Sprache relevanten tiefen und mittleren Frequenzen betrifft und im Vergleich zu älteren Studien deutlich ansteigt (Hesse und Laubert, 2005).

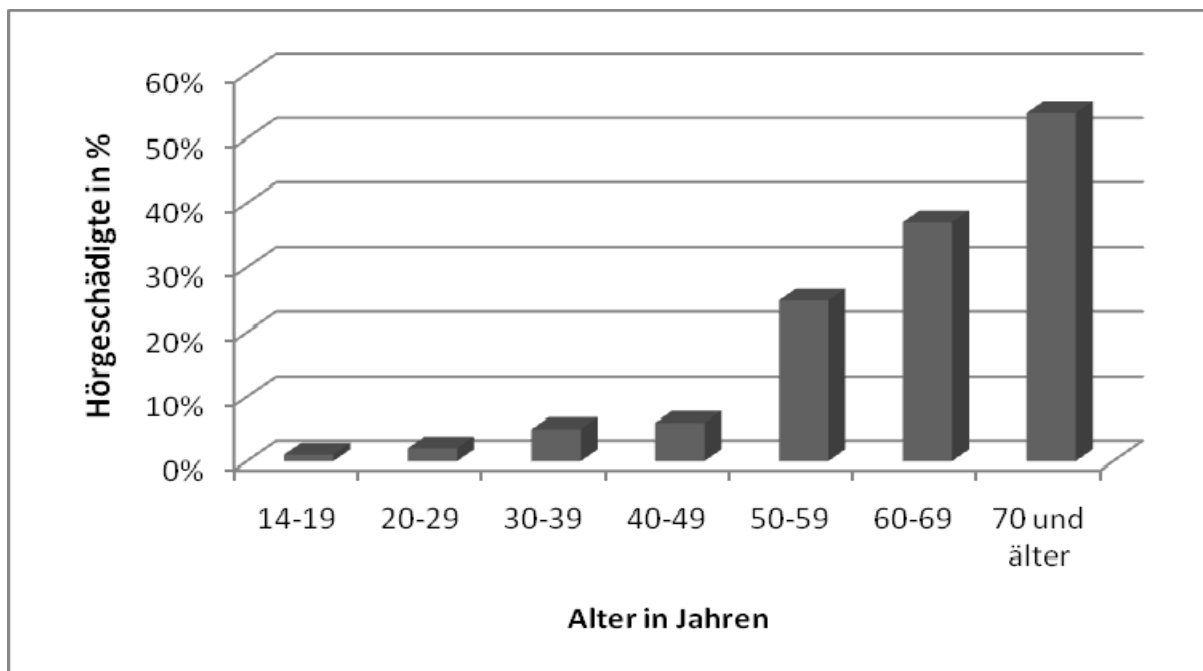


Abb. 1.1: Schwerhörigkeit in Deutschland: Prozentsatz der Hörgeschädigten mit zunehmenden Alter. Daten entnommen aus folgender Studie mit 2000 Probanden: Sohn (2000): Aktueller Stand der Schwerhörigkeit in Deutschland - Ergebnisse einer repräsentativen Hörscreening-Studie.

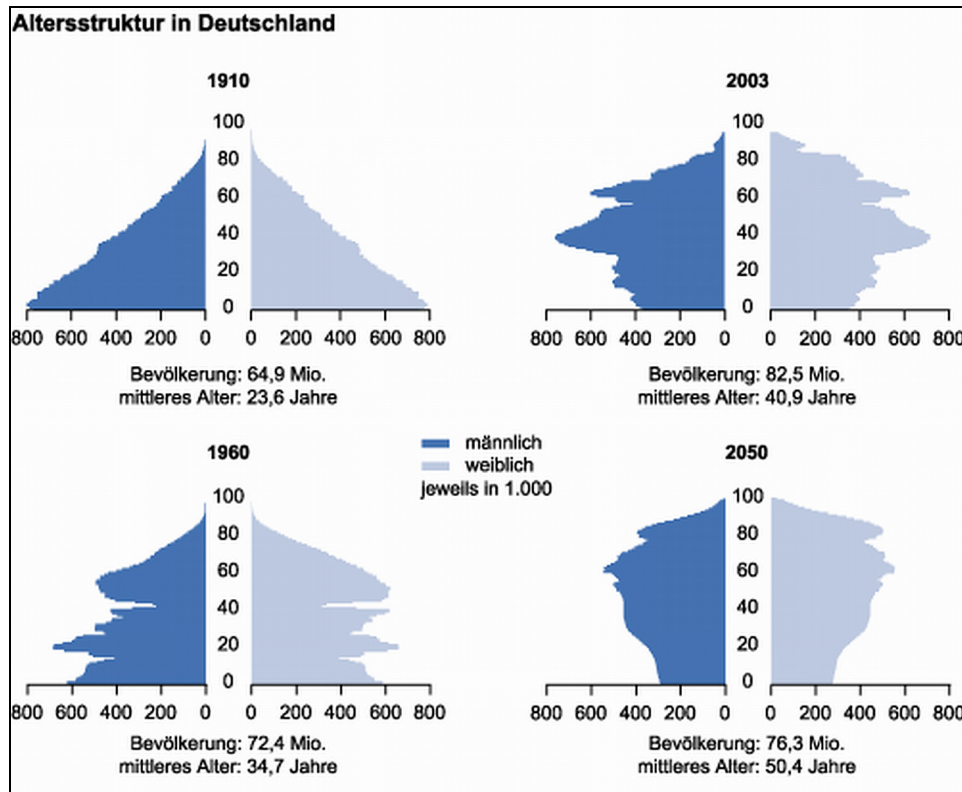


Abb. 1.2: Altersstruktur und demographischer Wandel in Deutschland: Von der Pyramidenform 1910 bis zum Bild einer Urne im Jahr 2050. Grafiken entnommen am 03.08.2010 von der Internetseite des Zentrums für demographischen Wandel:
http://www.zdwa.de/zdwa/artikel/diagramme/20051114_93777542_diagW3DnavidW2670.pp

Schließt man den demographischen Wandel, bei dem sich die Struktur der Alterspyramide immer mehr zugunsten der älteren Jahrgänge ändert, in die Betrachtungen mit ein, zeichnet sich ab, dass die Zahl der Betroffenen in den nächsten Jahrzehnten noch deutlich steigen wird (**Abb. 1.2**). Damit wächst auch die soziale und medizinische Relevanz der Altersschwerhörigkeit.

Dabei handelt es sich um eine komplexe Funktionsstörung, die eine langsame Verschlechterung des Hörvermögens ab dem fünften Lebensjahrzehnt mit sich bringt. Der meist symmetrische Hörverlust zeigt sich zunächst in den höheren Frequenzen, später auch im Mittel- und Tieftonbereich. Das Wortverständnis ist zunehmend eingeschränkt, was sich vor allem in geräuschvoller Umgebung bemerkbar macht (Cocktail-Party-Effekt). Das Verständnis einzelner Wortsilben ist dabei oft besser als das Verständnis des ganzen Satzes (Schizakusis). Zudem tritt unter Umständen ein Tinnitus auf, der vor allem in Ruhe sehr ausgeprägt wahrgenommen wird. Die sozialen Folgen der Altersschwerhörigkeit sind nicht zu unterschätzen, da neben der allgemeinen

Verunsicherung wegen der beeinträchtigten Kommunikationsmöglichkeiten häufig auch Misstrauen und soziale Ausgrenzung auftreten (Hesse und Laubert, 2005).

Schuknecht und Harold (1964) teilten die Presbyakusis nach audiologischen und histologischen Befunden in vier Grundtypen ein: Die metabolische Presbyakusis, in Form einer atrophischen Veränderung der Stria vascularis; die sensorische Altersschwerhörigkeit, die mit einem Verlust der Haarzellen in der Cochlea einhergeht; die mechanische Presbyakusis und die neuronale Altersschwerhörigkeit, die den Verlust neuronaler Funktionen durch das Zugrundegehen von Ganglienzellen in der Cochlea beschreibt. Arnesen (1982) konnte darüberhinaus bei einer Studie an Gehirnen von Personen, bei denen zu Lebzeiten eine Presbyakusis diagnostiziert wurde, degenerative Prozesse innerhalb der zentralen Hörbahn aufzeigen. Schon diese Erkenntnisse zeigen, dass die altersbedingte Schwerhörigkeit ihren Ursprung in den verschiedensten Stationen der Hörverarbeitung haben kann. Die Schwierigkeit liegt genau darin zu unterscheiden, ob die Defizite auf Veränderungen im Bereich des peripheren Abschnittes und bzw. oder auf einer gestörten Verarbeitung der akustischen Signale im zentralen Anteil des Hörsystems beruhen (Frisina und Frisina, 1997). Strutz (1991) gliedert den peripheren Abschnitt dabei in äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr sowie den zentralen Anteil in afferente und efferente Fasern der Hörbahn.

In einer Studie, die sich auf diese Unterscheidung des Ursprungs der Hörschwäche konzentriert, konnten Hesse und Laubert (2005) anhand audiometrischer Tests zeigen, dass bei Altersschwerhörigen in den meisten Fällen eine Mischform mit sowohl gestörter Innenohrfunktion als auch pathologischer zentraler Verarbeitung vorliegt. Bei etwa 13 % der Probanden dagegen war die Innenohrfunktion normal, die Ursache der Hörminderung lag allein in der zentralen Verarbeitung. Auch Strutz (1991) weist darauf hin, dass bei einem intakten peripheren Hörsystem Veränderungen in der Hörbahn zu einer gestörten Verarbeitung akustischer Informationen im Gehirn führen können.

Die Therapie des peripheren Hörverlusts ist mittlerweile gut etabliert, so stehen neben Hörgeräten, die den akustischen Eingang verstärken, Cochleaimplantate zur Verfügung, die den Hörnerv direkt reizen und damit die cochleären Hörstörung zumindest teilweise kompensieren. Maßnahmen, die auf die Ursachen des zentralen Hörverlusts abzielen, sind dagegen noch kaum entwickelt. So ist nicht nur der Personengruppe mit einer rein zentralen Hörstörung nicht geholfen, sondern auch alldenjenigen, die trotz scheinbar gut angepasstem Hörgerät nur eine unzureichende Besserung ihres Hörproblems erfahren,

da ihre Hörleistung wegen einer zusätzlichen Störung der zentralen Verarbeitung nicht ausreichend verbessert werden kann. Um dafür neue therapeutische Strategien entwickeln zu können, ist es zunächst notwendig, genauere Kenntnisse über die im Alter ablaufenden Veränderungen der zentralen Verarbeitung akustischer Signale und den dabei entscheidenden strukturellen und funktionellen Pathomechanismen zu sammeln. Zahlreiche Studien untersuchen aus diesem Grund die zentrale Hörbahn, um Mechanismen zu finden, die mit dem abnehmenden Hörvermögen in Einklang zu bringen sind. Physiologische und neurologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass dabei Veränderungen in der Funktion der Neurotransmitter eine entscheidende Rolle spielen (Mc Geer und Mc Geer, 1975). Es wird vermutet, dass Stationen innerhalb der Hörbahn durch einen Verlust inhibitorischer Botenstoffe (wie zum Beispiel γ -Aminobuttersäure, kurz: GABA) die Weiterleitung der akustischen Signale enthemmen und somit bei ansteigenden und multiplen Umgebungslauten die gehörten Informationen „ungefiltert“ ins Bewusstsein gelangen (Cremer und Zeef, 1987). Ließe sich tatsächlich ein altersabhängiges Ungleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Transmittern in den einzelnen auditorischen Kernen nachweisen, würde dies klinisch die Möglichkeit bieten, mit entsprechenden Medikamenten die Hörfähigkeit betroffener Menschen zu verbessern. Von Vorteil ist hierbei, dass Medikamente, die auf das GABAerge System im Gehirn einwirken auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen (z.B. Epilepsie) untersucht und entwickelt werden (Bialer et al., 2007). Ein Beispiel für einen solchen Wirkstoff ist γ -Vinyl-GABA, der das Enzym GABA-Transaminase hemmt und auf diese Weise die Wiederaufnahme und damit die Inaktivierung des inhibitorischen Transmitters GABA im synaptischen Spalt verzögert. Im Tierversuch konnte diese Substanz ein beeinträchtigtes Zeitauflösungsvermögen bei der Wüstenrennmaus positiv beeinflussen, kommt aber wegen unerwünschter Nebenwirkungen für eine Behandlung von Hörstörungen nicht in Betracht (Gleich et al., 2003; Hemming et al., 2008).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Colliculus inferior (IC), dem hinteren Teil der Vierhügelplatte (Lamina quadrigemina) des Mittelhirndachs (Tectum mesencephali). Er stellt die größte auditive Struktur im Hirnstamm dar (Webster, 1992) und spielt eine zentrale Rolle innerhalb der Hörbahn. Projektionen aller bedeutenden tiefer gelegenen Kerne der Hörbahn enden im IC (Adams, 1979; 1980), gleichzeitig ist er der wichtigste Ursprung auditiver Projektionen zum Vorderhirn (Aitkin und Phillips, 1984). Im

Folgenden soll dies durch eine grobe Eingliederung des Colliculus inferior in die Hörbahn (**Abb. 1.3**) verdeutlicht werden (vgl. Webster, 1992):

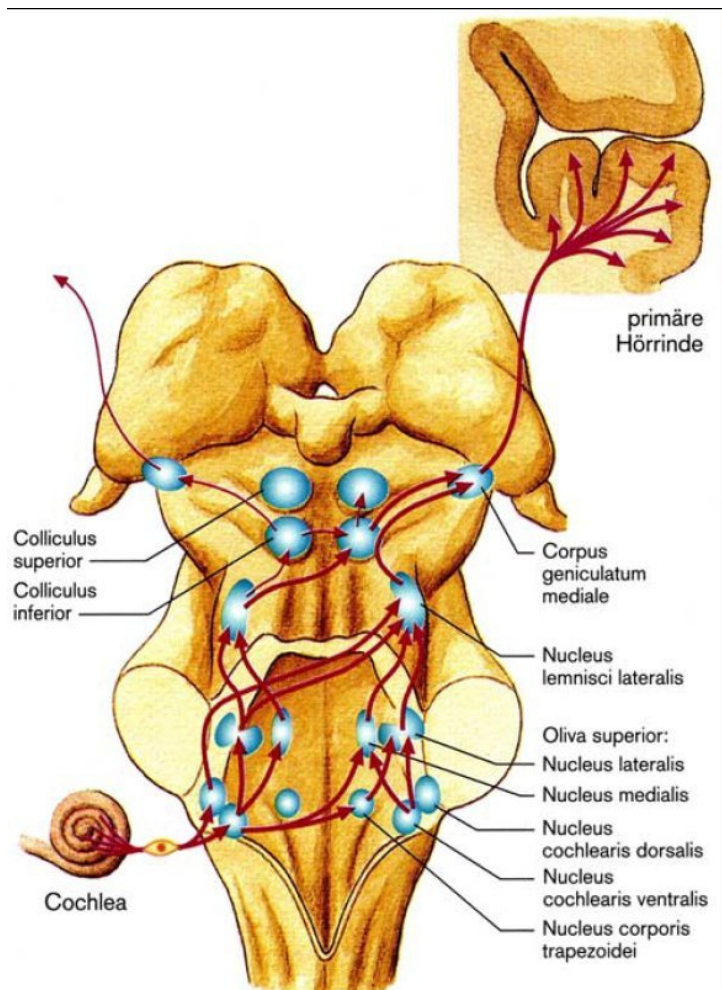


Abb. 1.3: Die Hörbahn: Modell des Hirnstamms mit den wichtigsten Kerngebieten der aufsteigenden Hörbahn (blaue Flächen) und dem Verlauf deren Fasern (rote Pfeile).

Abbildung entnommen am 28.07.2010 von der Internetseite der Universität Osnabrück:

http://www.musik.uni-osnabrueck.de/lehrende/enders/lehre/App_Musik_I/das_gehoer.htm

Diese beginnt formal gesehen im Innenohr mit den afferenten Fasern des Nervus acusticus, deren Perikaryen im Ganglion spirale liegen. Sie senden Informationen zu den Nuclei cochleares, wobei die in der Cochlea begonnene tonotope Gliederung wie im gesamten folgenden auditiven System erhalten bleibt. Von den Nuclei cochleares zieht ein geringer Teil der Hörbahnfasern zum ipsilateralen Colliculus inferior und ein größerer Teil als starkes Faserbündel (Corpus trapezoideum) zur Gegenseite. In dieses sind einzelne Kerne zwischengeschaltet (Nuclei olivares superiores und die Kerne des Corpus trapezoideum). Auf der contralateralen Seite ziehen die Fasern über den

Lemniscus lateralis zum Colliculus inferior auf, wiederum unter teilweiser Verschaltung in einem weiteren Kernkomplex (Nuclei lemnisci lateralis). Einzelne parallel aufsteigende Hörbahnfasern, gegründet im cochlearen Kernkomplex konvergieren also in einem einzigen Kern im Mittelhirn, dem Colliculus inferior, der somit das Integrationszentrum für aufsteigende monaurale und binaurale Informationen darstellt. Der Hauptteil der Neurone des IC sendet seine Axone zum ventralen Teil des Corpus geniculatum mediale im Thalamus, wo die akustischen Reize durch das limbische und kortikale System moduliert werden. Von dort aus gelangt die Information über die Capsula interna zum primären auditiven Kortex im Temporallappen. Hier findet die Integration des Gehörten mit höherwertiger Kommunikation und kognitiven Netzwerken statt.

Der histologische Aufbau des IC lässt durch wenig klare Abgrenzungen keine offensichtliche interne Untergliederung zu (Oliver, 2005). Der am ehesten ersichtliche Teilbereich ist der zentrale Kern (ICC), der den Hauptteil der aufsteigenden auditorischen Projektionen erhält. Er ist umgeben von einem dorsalen (DC) und einem lateralen bzw. externen Cortex (LC) (Faye-Lund und Osen, 1985). Obwohl die Bezeichnung eines „zentralen Kerns“ seit vielen Jahren in Gebrauch ist, hängt die explizit damit gemeinte Region im IC stets von der methodischen Herangehensweise und Interpretation ab (Oliver, 2005). Erwiesen ist dagegen eine tonotopische Organisation, wobei die Frequenzachse von dorsal bzw. dorso-lateral (tiefe Frequenzen) nach ventral bzw. ventro-medial (hohe Frequenzen) verläuft (Merzenich und Reid, 1974; Ryan et al., 1988).

Anhaltspunkte für die zentrale Rolle des Colliculus inferior in der Verarbeitung von Hörreizen konnten audiometrische Tests mit einem Jungen liefern, der eine umschriebene Läsion des rechten IC ohne weitere neurologische Beeinträchtigungen erlitten hat. Sie ergaben auf beiden Seiten eine normale Funktion des peripheren Hörsystems. Dagegen zeigten sich wie erwartet Defizite bei der Verarbeitung komplexerer Schallsignale bei denen eine binaurale Schallverarbeitung eine Rolle spielt (Champoux et al., 2007).

Es gibt zahlreiche Studien, die belegen, dass GABA der wichtigste inhibitorische Transmitter im IC ist. Vater et al. (1992) konnten mit Hilfe der Mikroiontophorese-Technik zeigen, dass 98 % der Neurone im zentralen Kern des IC durch GABA gehemmt werden. Weitere Erkenntnisse brachten in vivo und in vitro Studien, bei denen

intrazellulär in Neuronen des IC Inhibitorische Postsynaptische Signale (IPSPs) aufgezeichnet wurden, die durch GABA-Antagonisten blockiert werden konnten (Kuwada et al., 1980). Wurden GABA-Rezeptoren im IC von Mäusen bzw. Fledermäusen mit dem Antagonisten Bicucullin gehemmt, fiel die exzitatorische Antwort der Neurone auf dargebotene Ton-Stimuli deutlich höher aus als bei der Kontrollgruppe (Caspary et al., 1995; Vater et al., 1992). Dies lässt darauf schließen, dass der Verlust GABAerger Neurone im IC mit einer Enthemmung aufsteigender Reize in der Hörbahn einhergeht. Faingold et al. (1989) konnten zeigen, dass die Fähigkeit, eine Geräuschquelle exakt zu lokalisieren, von einer durch den Botenstoff GABA vermittelten binauralen Hemmung im IC abhängig ist. Kann man nun davon ausgehen, dass die im Rahmen der Altersschwerhörigkeit vorkommenden Beschwerden teilweise auf eine verminderte Funktion GABAerger Neurone im Colliculus Inferior zurückzuführen sind?

In bisherigen Arbeiten wurden bereits verschiedene Effekte des Alterns auf die Morphologie und den Stoffwechsel GABAerger Neurone im Colliculus inferior beschrieben. Caspary et al. (1990) konnten eine selektive Abnahme (- 36 %) der Anzahl GABAerger Neurone im IC alter Ratten gegenüber Messungen bei jungen Ratten nachweisen. Diese Beobachtung konnten andere Studien mit Ratten unterstützen, in denen bei alten Tieren signifikant geringere (- 22 bis - 30 %) Konzentrationen von GABA im IC gefunden wurden (Banay-Schwartz et al., 1989). Dagegen zeigte eine Arbeit von Helfert et al. (1999) nur eine Verminderung GABA-positiver Synapsen und Synapsenendungen, nicht aber der Anzahl der Neurone selbst. Untersuchungen zur Veränderung der Größe des zentralen Korns (CN) des IC im Alter brachten bislang uneinheitliche Ergebnisse hervor. Während Caspary et al. (1995) keine offensichtliche Veränderung der Größe feststellen konnten, beschreiben Helfert et al. (1999) sogar eine Zunahme des IC Volumens von 3 Monate alten zu 19 bzw. 28 Monate alten Ratten. Desweiteren konnten bei Einzelzellableitungen von dem IC älterer Ratten ein signifikant geringerer Grad an Inhibition innerhalb des exzitatorischen Antwortbereiches und ein Anstieg des Umfangs des Antwortbereiches selbst gezeigt werden (Palombi und Caspary, 1996 b).

Die Schwierigkeit bei den oben beschriebenen Befunden ist die Frage, ob diese wirklich das Resultat von altersbedingten Veränderungen im IC selbst sind (also zentral bedingt und nicht ausgelöst durch eine periphere Hörstörung) oder aber durch einen Verlust von peripherem Input hervorgerufen werden. Diesbezüglich weisen neurochemische

Untersuchungen darauf hin, dass eine Beeinträchtigung des peripheren auditorischen Systems mit einer selektiven Abnahme GABAerger Funktionen im normal alten IC einhergeht (Caspary et al., 2008). In dem Großteil der oben genannten Studien wurden Ratten und Mäuse als Versuchstiere verwendet, bei denen es im Alter nachgewiesenermaßen häufig zu einem ausgeprägten peripheren Hörverlust kommt (Bielefeld et al., 2008; Keithly et al., 1992; Syka, 2010), so dass es schwieriger erscheint, eine klare Aussage über die Ursache der beschriebenen altersbedingten Änderungen im IC zu treffen.

Die vorliegende Arbeit soll der Frage nach altersbedingten Veränderungen im Colliculus inferior deshalb erneut nachgehen und dabei als Versuchstiere Wüstenrennmäuse verwenden, deren peripheres Hören durch Alterungsprozesse weniger beeinflusst wird (Hamann et al., 2002) und die dadurch möglicherweise geeigneter sind, rein „zentrale“ Entwicklungen aufzuzeigen. Anhand immunhistologischer Hirnschnitte junger und alter Tiere sollen mögliche Alterseffekte sowohl auf die Größe des IC als auch auf die Anzahl und Dichte GABAerger Neurone untersucht werden. Außerdem wird geprüft, ob sich die Größe und die Expression GABAerger Zellen innerhalb der dorsoventralen Achse im Alter unterschiedlich verändert und damit bestimmte Frequenzbereiche mehr oder weniger vom Alterungsprozess betroffen sind.

2. Material und Methoden

2.1 Die Verwendung der Mongolischen Wüstenrennmaus als Versuchstier in der Hörforschung

Die Mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*), zur Klasse der Säuger (Mammalia) gehörend, ist Mitglied der Ordnung Nager (Rodentia), der größten Gruppe der Säugetiere. Weiter zählt sie zur Unterordnung der Mäuseverwandten (Myomorpha), der Überfamilie der Mäuseartigen (Muroidea) und wird der Familie der Langschwanzmäuse (Muridae) und deren Unterfamilie der Rennmäuse (Gerbillinae) zugeordnet (Systematik entnommen vom National Museum of Natural History unter: <http://vertebrates.si.edu/mammals/msw/>). Ihre ursprüngliche Heimat sind die Steppen und Halbwüsten der Mongolei und Nordchinas. Erstmals wurde die Art im Jahr 1867 beschrieben (Milne-Edwards, 1867), 1935 wurde eine Gruppe von 40 Tieren im Osten der Mongolei gefangen, deren Nachfahren dann als „Laboratory gerbils“ Einzug in die Forschung erhielten (Rich, 1968; Stuermer et al., 2003).

Die in dieser Arbeit verwendeten 34 Gerbils stammen aus einer eigenen Zucht der Forschungsabteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Regensburg, wo seit 1992 mit Wüstenrennmäusen Untersuchungen zu Hörexperimenten durchgeführt werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf morphologischen Untersuchungen zur Charakterisierung altersbedingter Veränderungen im auditorischen System. Obwohl Gerbils kleine Säugetiere sind, haben sie ein sehr gut entwickeltes Hörvermögen. Es umfasst den Frequenzbereich von 0,1- 60 kHz mit einer besonderen Sensibilität im für die menschliche Sprache relevanten tieffrequenten Bereich (Ryan, 1976), während der Frequenzbereich anderer Säugetiere deutlich davon abweicht (**Abb. 2.1**). Diese Gegebenheit scheint auf der speziellen Konfiguration ihres auf den natürlichen Wohnraum angepassten Hörapparates zu beruhen, wo wegen der geringen Luftfeuchtigkeit die Kommunikation über tiefe Frequenzen vorteilhaft ist (Urquiza et al., 1988). Die Ähnlichkeit ihres Hörvermögens zu dem des Menschen und die Tatsache, dass sie sich leicht in Gefangenschaft züchten lässt, sich schon mit 3 Monaten fortpflanzt und ein Alter von 3-4 Jahren erreicht, macht die Wüstenrennmaus zu einem verbreiteten und bevorzugten Modell in der Hörforschung.

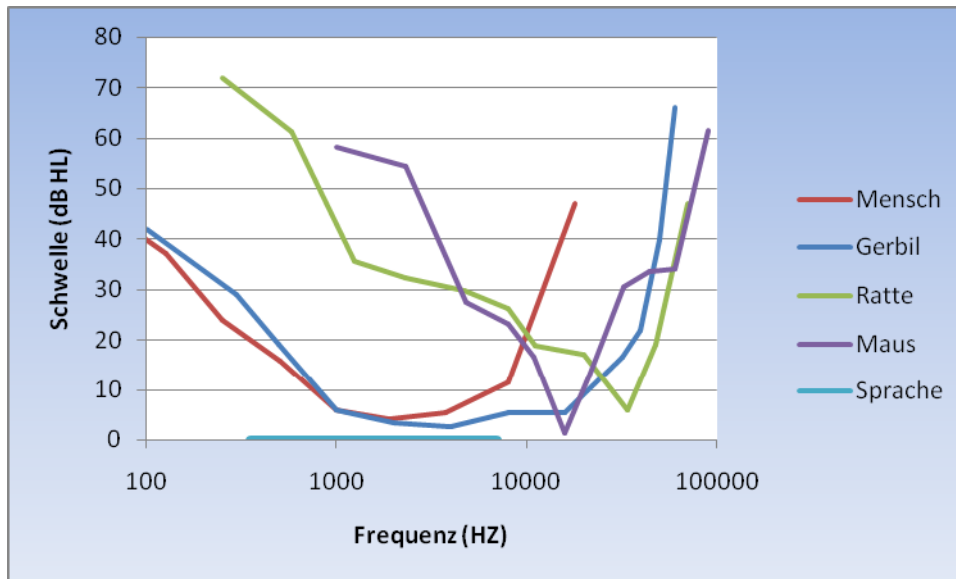


Abb. 2.1: Hörbereiche verschiedener Spezies. Das Diagramm zeigt die Ähnlichkeit des Hörvermögens von Mensch und Wüstenrennmaus in dem für die Sprache bedeutsamen Frequenzbereich. Die Daten für die Grafik wurden aus den Sammlungen von Fay, R. (1988) entnommen. Bei Mensch, Maus und Ratte wurde dabei der Mittelwert aus mehreren Audiogrammen gebildet, die Daten für das Gerbil-Diagramm wurden direkt übernommen. Der horizontale blaue Balken an der X-Achse zeigt den für das Sprachverständnis bedeutendsten Frequenzbereich.

2.2 Herstellung der histologischen Schnitte

Zur besseren Übersicht werden die Zusammensetzungen der im Folgenden aufgezählten Lösungen in einer Tabelle am Ende des Textes dargestellt (**Tab. 2.1**).

Für die Narkose wurden den Tieren intraperitoneal 0,6–0,8 ml eines Xylazin-Ketamin-Narkosegemisches injiziert. Diese Dosis ist tödlich und führt nach einigen Minuten zum Atemstillstand. Nach dessen Eintritt wurde der Brustkorb auf Höhe des Processus xyploideus eröffnet, das Herz dargestellt und aus dem Perikard freigelegt. Durch einen kleinen Schnitt in der linken Hauptkammer wurde die Perfusionskanüle eingeführt und dann die rechte Herzkammer eröffnet. Bei einer Perfusionsrate von 6-8 ml/min wurde transcardial für 1-2 Minuten mit 0,9 % NaCl-Lösung das Blut ausgespült, bevor dann für 30 Minuten die Fixierlösung perfundiert wurde.

Nach Entfernung der Schädelkalotte wurde das Gehirn aus der Schädelkapsel freipräpariert. Dabei war ein vorsichtiges und sorgfältiges Vorgehen von Bedeutung, um die entscheidenden anatomischen Strukturen nicht zu verletzen. Außerdem wurden der äußere Gehörgang und das Mittelohr auf etwaige Verstopfungen und Infektionen untersucht, die Ursachen einer Hörstörung sein könnten.

Die Gehirne wurden dann für 30 Minuten in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) (PB) gewaschen und über Nacht mit einer 30 % Saccharose- Lösung in PB im Kühlraum auf dem Schüttler durchtränkt, um Einfrierartefakte (Kristallbildung) zu vermeiden. Anschließend wurde das vordere nicht benötigte Drittel abgeschnitten, das Gehirn mit etwas Wasser senkrecht auf den Objekthalter des Kryostaten aufgefroren und mit dem Einfriermedium Tissue Tek der Firma Jung umschlossen.

Von den Gehirnen wurden frontale Schnittserien mit einer Schnittdicke von 25 µm am Gefriermikrotom (Cryostat, Fa. Leica) angefertigt und diese nacheinander in „24-well“ Platten der Firma Greiner mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (PBS) zum Waschen aufgenommen, so dass vier alternierende Schnittserien mit einem Abstand von 100 µm der jeweils aufeinander folgenden Schnitte entstanden. Auf diese Art und Weise konnten die einzelnen Schnittserien verschiedenen Färbungen unterzogen werden, an dieser Stelle soll das Prozedere der GABA-Färbung, die in der vorliegenden Studie verwendet wurde, beschrieben werden.

Die Schnittserien, die für die GABA-Färbung ausgewählt waren, wurden dreimal 10 Minuten in Phosphat-Puffer mit 0,9 % NaCl (PBS) gewaschen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch eine 60 Minuten dauernde Inkubation in PBS mit 3 % H₂O₂ und 10 % Methanol blockiert. Nach der Blockade folgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte für 10 Minuten in PBS. Hinzu kamen zwei weitere Waschdurchgänge mit PBST. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte 30 Minuten in einer Milchpulverlösung inkubiert.

Ohne weiteres Waschen wurde für den immunhistochemischen Nachweis von GABA der primärer Antikörper (monoklonales Maus-Anti-GABA) mit Waschpuffer verdünnt und die Schnitte darin zwei Tage auf dem Schüttler im Kühlraum bei + 4 °C inkubiert. Jeder sechste Schnitt wurde als Negativkontrolle mit einer antikörperfreien Lösung versetzt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBST wurde die Schnittserie mit dem sekundär-Antikörper (biotinylierter Esel gegen Maus Antikörper) versetzt und nach zweistündiger Inkubation nochmals wie oben beschrieben dreimal für 10 Minuten in PBST gewaschen.

Zur Verstärkung der Reaktion wurde ein mit Merrettichperoxidase konjugierter Avidin-Biotin-Komplex der Firma Vector entsprechend deren Gebrauchsanleitung eingesetzt und die Schnitte hinterher dreimal mit PBST gewaschen. Die Schnitte wurden dann 10 Minuten einer Färbung mit Diaminobenzidin-(DAB) Lösung unterzogen und

anschließend 10 Minuten in durch H_2O_2 aktivierter DAB-Lösung inkubiert, um eine endgültige Konzentration von 0,006 % zu erreichen. Der Färbeporgang wurde durch eine dreimalige Waschung mit PBST-Puffer gestoppt und über Nacht bei + 4 °C eingelagert.

Am Folgetag wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewässert und geordnet, in richtiger Ausrichtung auf die Objektträger aufgezogen und getrocknet. Diese wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und zur weiteren Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) gebracht, in Xylol überführt und mit dem Einschlussmittel Entellan der Firma Merck und einem Deckglas eingedeckt.

Lösung	Zusammensetzung
Xylazin-Ketamin-Narkosegemisch	0,3 ml Ketaminhydrochlorid [Ketamin] 10 %, (Ketavet, Fa. Parke Davis) + 0,4 ml Xylazinhydrochlorid [Xylazin] 2 % (Rompun, Fa. Bayer)
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd + 0,1 % Glutardialdehyd in 0,1 M Na-Phosphatpufferlösung bei pH 7,4
PB	0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,4)
Saccharose- Lösung	30 % Saccharose in Phosphatpuffer
PBS-Puffer	PB mit 0,9 % NaCl
Blockierlösung	PBS + 3 % H_2O_2 + 10 % Methanol
PBST	PBS + 0,4 % Triton X100
Milchpulverlösung	10 % Esel Serum (Fa. Dianova) + 2,5 % Magermilchlösung (Fa. Milupa) + 0,3 % Triton X100 in PBS
Primärer Antikörper	monoklonales Maus-Anti-GABA, MAB316, 1:200, Fa. Chemicon
Sekundärer Antikörper	biotinylierter Esel gegen Maus Antikörper, 1:400, Fa. Dianova
Waschpuffer	0,1 % normales Esel Serum + 0,3 % Triton X100 + 2,5 % Magermilchlösung
DAB-Lösung	0,05 % DAB + 0,02 % Ammonium Nickel Sulfat in PBST
aktivierte DAB-Lösung	10 ml DAB + 9 μ l 1 % iges H_2O_2

Tab. 2.1: Für die histologische Aufarbeitung benötigte Lösungen und ihre Zusammensetzung.

2.3 Auswahl der zu untersuchenden Schnitte

Um den Colliculus Inferior auf den histologischen GABA-gefärbten Schnitten zu lokalisieren, wurden diese an einem Lichtmikroskop (Laborlux S, Fa. Leica) mit 10- bis 20-facher Vergrößerung systematisch von kaudal nach rostral durchgesehen (**Abb. 2.2**). Als Orientierungsstruktur galt der Beginn des IC als uniforme ovale Struktur im Hirnstamm, ventral begrenzt vom subcollicularen Tegmentum (beschrieben von Oliver, 2005).

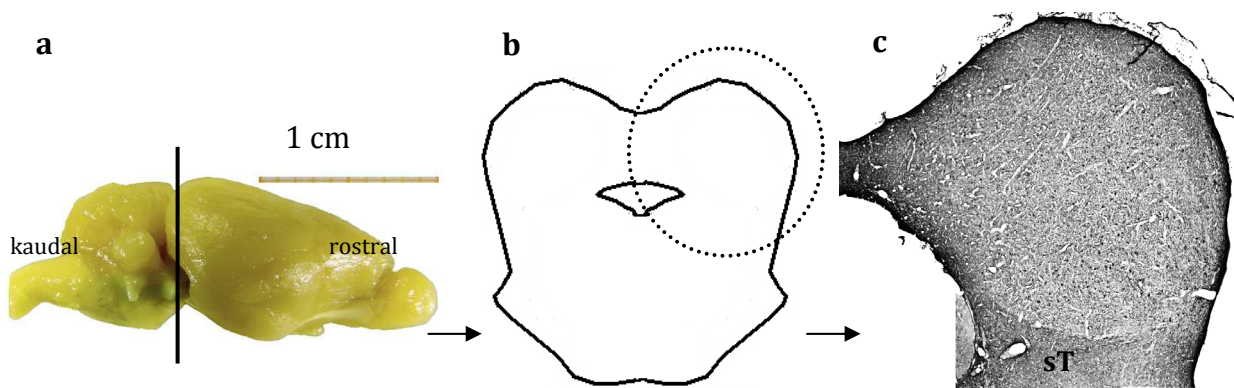


Abb. 2.2: Vom freipräparierten Gehirn über frontale Schnittserien zur immunhistochemischen Darstellung von GABA im Colliculus inferior des Gerbils.

a: photographische Darstellung des freipräparierten Gehirns einer Mongolischen Wüstenrennmaus von lateral. Die vertikale schwarze Linie markiert die Schnittrichtung, die helle horizontale Linie zeigt den Maßstab.

b: schematische Darstellung eines Frontalschnittes durch das Gehirn der Wüstenrennmaus auf Höhe des Colliculus inferior. Der gestrichelte Kreis zeigt dessen Lage.

Abbildung a + b entnommen und modifiziert nach dem Kongressposter von Gleich, O. et al. (2008).

c: Colliculus Inferior (Tier 711), ventral begrenzt vom subcollicularen Tegmentum (sT), nach immunhistochemischer Färbung, Aufnahme und Digitalisierung der ausgewählten Schnitte.

Um bei allen Serien einen vergleichbaren Schnitt innerhalb des IC festlegen zu können, wurden zwei Landmarken benutzt. Kaudal war dies jeweils der erste Schnitt mit erkennbarem, an das Tegmentum angebundenem IC (vergleichbar mit Bild 1. in Abb. 2.3) und in rostraler Ausdehnung der Schnitt, bei dem der Colliculus superior (SC) erstmals getroffen war (vergleichbar mit dem letzten Bild in Abb. 2.3). Ausgewählt wurde dann derjenige Schnitt, der rechnerisch in der Mitte der genannten kaudo-rostralen Ausdehnung zwischen diesen beiden Landmarken lag und für die weiteren

Untersuchungen auch verwendbar war (keine Artefakte, keine Kontrollfärbungen, Landmarken vorhanden). Zusätzlich zur direkten Betrachtung im Mikroskop wurden die Bilder zur Beurteilung über eine digitale Videokamera (CCD119 Color, Fa. Mitsubishi) mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms PicEd Cora (Version 8.38, Fa. Metzger EDV) auf einen Monitor übertragen.

Bei dem beschriebenen Auswahlverfahren wurde Bezug auf einen bereits existierenden Atlas des IC des Gerbils (Cant und Benson, 2005) genommen. Er wurde mit der Cytochrom-Oxidase Methode angefertigt, einem funktionellen Marker zur Differenzierung verschiedener Gebiete im Hirnstamm. Bei dieser Studie von Cant und Benson wurden 40 μm dicke transversal-Schnittserien angefertigt und jeder zweite Schnitt (entsprechend einem Abstand von 80 μm) abgebildet. Die für die Analyse GABAerger Zellen ausgewählten Schnitte dieser Arbeit liegen im Bereich von drei aufeinanderfolgenden Schnitten des Atlases von Cant und Benson (**Abb. 2.3**, 1.-3.).

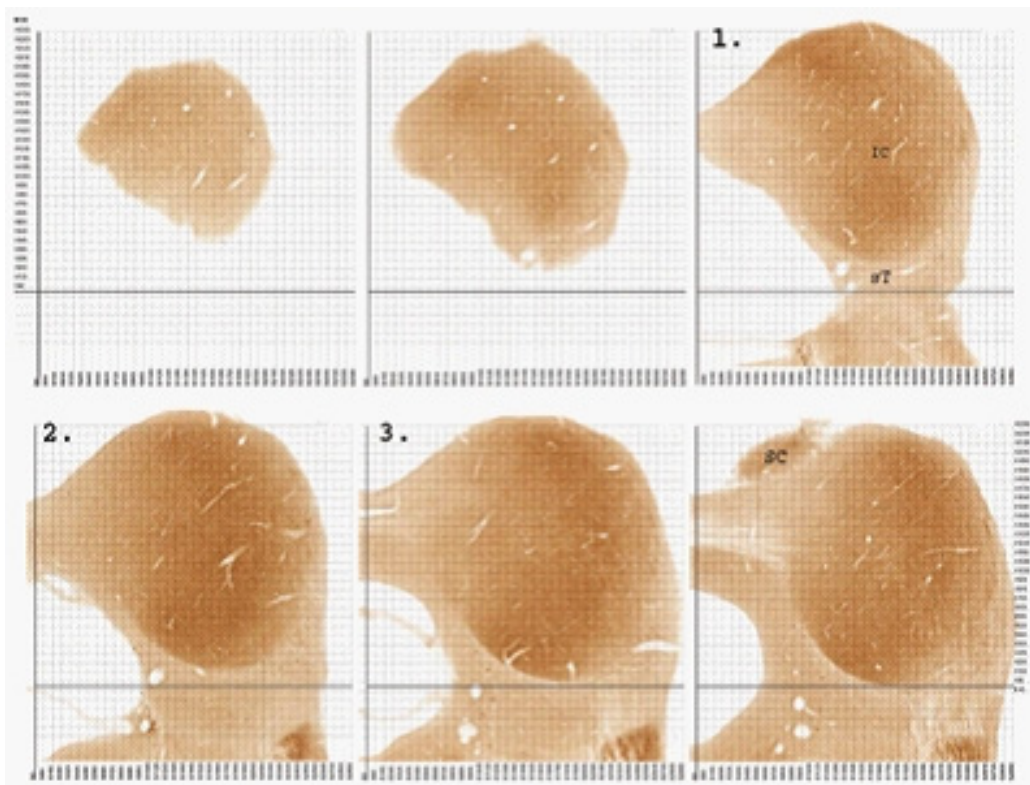


Abb. 2.3: Transversale Atlasschnitte durch den IC des Gerbils, nach Reaktion mit Cytochromoxidase-Aktivität, mit einem Abstand von 80 μm von kaudal nach rostral angeordnet (Cant und Benson, 2005). Die nummerierten Schnitte stellen den maximalen Referenzbereich der für die vorliegende Arbeit ausgewählten Schnitte dar.

So konnte gewährleistet werden, dass die ausgesuchten Schnitte in einem Referenzbereich von maximal 160 μm liegen. Von insgesamt 64 Tieren wurden auf diese

Weise jeweils entweder ein rechter oder ein linker IC bei 34 Tieren für die folgende quantitative Auswertung GABAerger Zellen ausgewählt. Das Alter und eventuelle Entzündungen im Gehörgang oder im Mittelohr der ausgewählten Tiere blieben während der gesamten Datenerfassung unbekannt, womit die Studie blind erfolgte.

2.4 Aufnahme und Digitalisierung der ausgewählten Schnitte

Mit einem Mikroskop der Firma Leica (Leitz DM- RBE) und einem Objektiv 20-facher Vergrößerung wurde der gesamte Bereich des IC mittels einer angeschlossenen Digitalkamera „Spot 2000“ (Diagnostic instruments, inc.) und der Software Metamorph (Version 3.6) unter identischen Beleuchtungsparametern abfotografiert. Vor jeder Bild-Digitalisierung wurde die optimale Köhlersche Beleuchtung am Mikroskop eingestellt. Die Graufilter wurden angepasst und die Einstellung blieb während der gesamten Aufnahmen unverändert. Die Lampenspannung wurde auf 10,5 geregelt. Sonstige Filter wurden aus dem Strahlengang entfernt. In Vorversuchen wurde für den roten Kanal der Kamera im 12bit Modus eine Belichtungszeit von 0,6 Sekunden ermittelt, bei der sowohl bei hellen als auch bei dunklen Präparaten die Grauwertverteilung weder in den dunklen noch in den hellen Stellen abgeschnitten wurde, die dunkelste Präparatstelle also einen Wert über 1 und die hellste einen Wert unter 4095 hatte. Alle Bilder wurden anschließend mit dieser Belichtungszeit aufgenommen. Um die Bildqualität nicht durch unvermeidbare Verunreinigungen und kleine Unregelmäßigkeiten in der Beleuchtung zu beeinträchtigen wurde vor jeder Sitzung in der Bilder digitalisiert wurden, ein Hintergrundbild an einer leeren, sauberen Präparatstelle aufgenommen und eine Maske hergestellt, die dann von den weiteren Bildern subtrahiert werden konnte (Hintergrundsubtraktion). Um einen Überblick des gesamten IC bei hoher Auflösung (in Verbindung mit dem 20x Objektiv ergab sich eine Auflösung von 0,35 μm pro Pixel) zu erhalten, mussten 40 bis 50 leicht überlappende Einzelbilder aufgenommen werden. Diese mit einer Grautiefe von 12 bit digitalisierten Bilder wurden von Metamorph aus als 16 bit Bild im TIF-Format gespeichert.

2.5 Weitere Bildverarbeitung am PC

Zur weiteren Bearbeitung der abfotografierten Bilder wurde das Programm Adobe Photoshop 7.0 verwendet. Da die von der Kamera im 12 bit Modus generierten Bilder

(4096 Graustufen) von Metamorph im 16 bit Format (65536 Graustufen) abgespeichert wurden, musste zunächst eine Tonwertkorrektur erfolgen um eine angemessene visuelle Darstellung am Bildschirm (die nur mit 256 Graustufen erfolgt) zu erreichen. Die Schritte dieser Tonwertanpassung wurden an einigen besonders dunkeln und hellen Beispielen so ermittelt, dass weder bei hellen noch bei dunklen Schnitten die Grauwertverteilung beschnitten wurde (Clipping). Die so ermittelte Tonwertanpassung wurde dann auf alle Bilder angewandt. Um dann aus den Einzelbildern im Photoshop eine Übersicht des gesamten IC zusammenzusetzen, mussten die Bilder erst in den 8-bit Modus umgewandelt und separat abgespeichert werden. Dann wurden die 40-50 Einzelbilder eines IC als separate Ebenen in Photoshop importiert und zu einer Übersicht zusammengefügt. Diese Übersicht wurde einmal mit den einzelnen Ebenen gespeichert um ggf. noch später Korrekturen vornehmen zu können und zum anderen wurden für die Analyse alle Ebenen auf die Hintergrundebene reduziert und die gesamte Übersicht als neue TIF-Datei abgespeichert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden sämtliche Bilder vom linken IC horizontal gespiegelt. Zusätzlich wurden die Übersichten wenn nötig so gedreht, dass die dorso-ventrale Achse senkrecht von oben nach unten verlief. Ein auf diese Art und Weise aus den einzeln erstellten Fotos fertig zusammengesetztes Bild des Colliculus inferior von Tier 711 ist in Abb. 2.2c zu sehen.

2.6 Vermessung des Colliculus inferior und Zählung der GABAergen Neurone

Für die Vermessung des IC sowie für die Analyse der lokalen Verteilung GABAerger Neurone wurde ein 100x100 µm Messraster benutzt. Dieses Raster wurde im Photoshop für eine Fläche von 4x4 mm generiert. Das Bild des IC (alle Übersichten waren kleiner als 4x4 mm) wurde dann als separate Ebene unter die Rasterebene importiert (**Abb. 2.4a**). Die mit dem Raster überlagerten IC-Übersichten wurden dann in 225-facher Endvergrößerung auf einem Plotter (Design Jet 5500 PS, Firma HP) als 90x90 cm Plakate ausgedruckt.

Zunächst musste nun der zu bewertende Bereich des IC festgelegt werden. Da bei der vorliegenden immunhistochemischen GABA-Färbung die Gliederung in einen zentralen Kern (ICC), dorsalen Kortex (DC) und lateralen Kortex (LC) visuell nicht eindeutig erkennbar war, konnte nur der gesamte IC betrachtet werden. Als dorsale und laterale

Begrenzung galt der äußerste Rand des Kortex, die ventrale Ausdehnung ließ sich durch das subcolliculare Tegmentum ebenfalls deutlich festlegen.

Da medial keine histologisch klar erkennliche Struktur vorhanden war, wurde die ventrale Rundung des subcollicularen Tegmentums fortgeführt und mit dem Rand des dorsalen Kortex verbunden. Durch dieses einheitliche Vorgehen konnte ein reproduzierbarer Bereich für die weiteren Untersuchungen festgelegt werden (**Abb. 2.4b**, schwarze Linie).

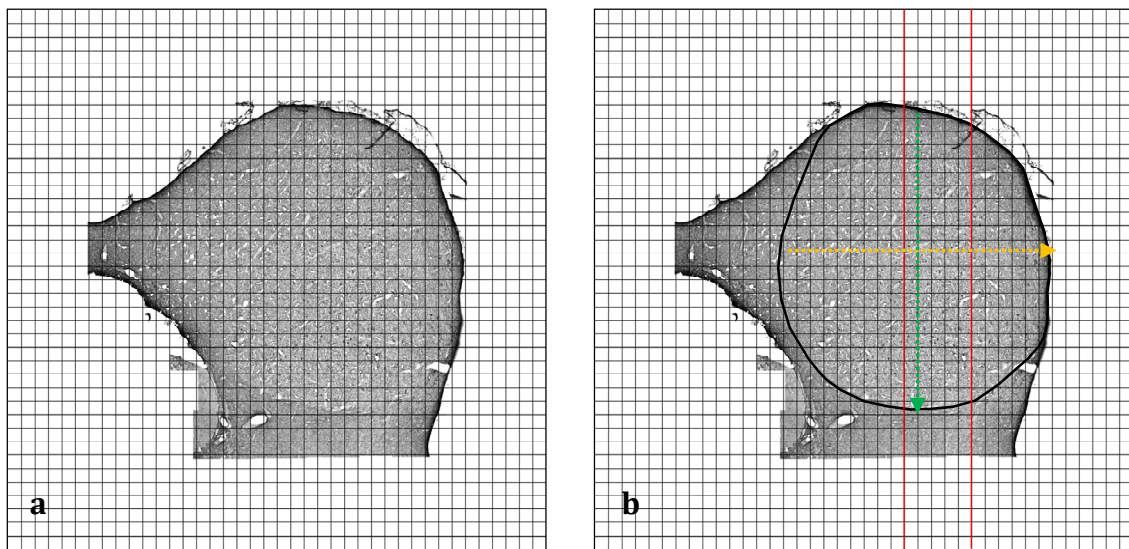


Abb. 2.4: Vermessung des Colliculus inferior mit Hilfe eines Rasters.

a: In das Raster eingefügtes Bild des IC von Tier 711.

b: Begrenzung des IC entsprechend der Querschnittsfläche (schwarze Linie) und des zur Untersuchung eines tonotopen Gradienten in der dorso-ventralen Achse ausgewählten Bereichs (zwischen den roten Linien), in dem detaillierte Messungen der GABAergen Zellen vorgenommen wurden. Der gelbe Pfeil zeigt die maximale Breite (mediolaterale Ausdehnung), der grüne Pfeil die maximale Höhe (dorsoventrale Ausdehnung) des IC.

Zur besseren Darstellung wurden für die hier gezeigten Abbildungen die Gitternetzlinien des Rasters verbreitert. Auf den Postern mit 225-facher Endvergrößerung wurde eine entsprechend geringere Breite gewählt, die gerade sichtbar war und somit keine relevanten Strukturen verdecken konnte.

Zur Vermessung der IC-Querschnittsfläche wurden alle innerhalb des festgelegten Bereichs liegenden Rasterkreuzungspunkte gezählt und damit die Querschnittsfläche stereologisch nach der Punktzählmethode (Gundersen und Jensen, 1987) berechnet, da jeder Kreuzungspunkt eine Fläche von $10000 \mu\text{m}^2$ repräsentiert. Diese Methode ist ein effizientes Hilfsmittel zur Messung von Flächen und Volumina, da ihre Genauigkeit nicht

später die zu einer Gruppe (z.B. junge Tiere) gehörenden IC-Daten übereinandergelegt und gemittelt werden.

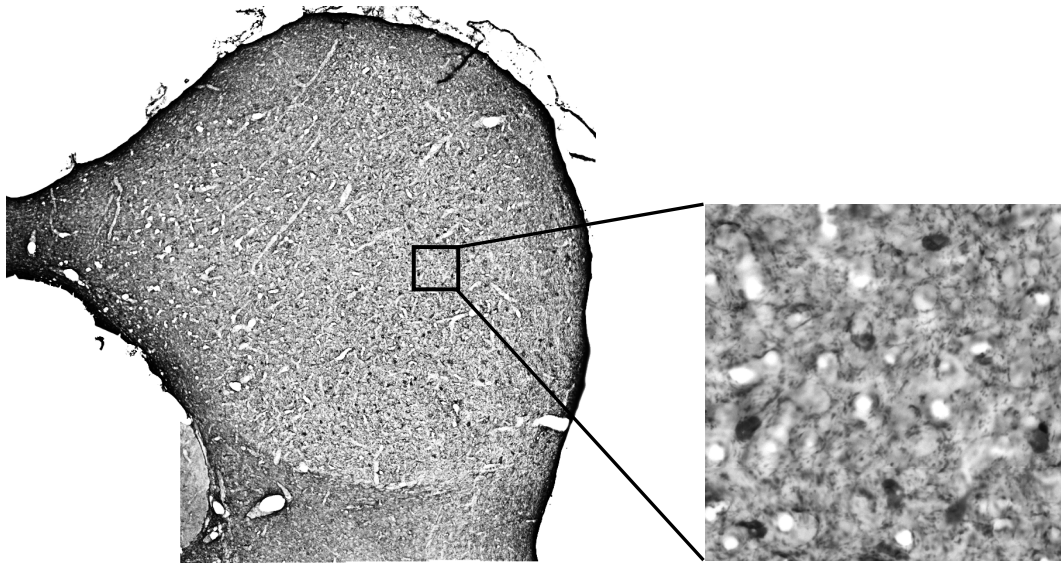
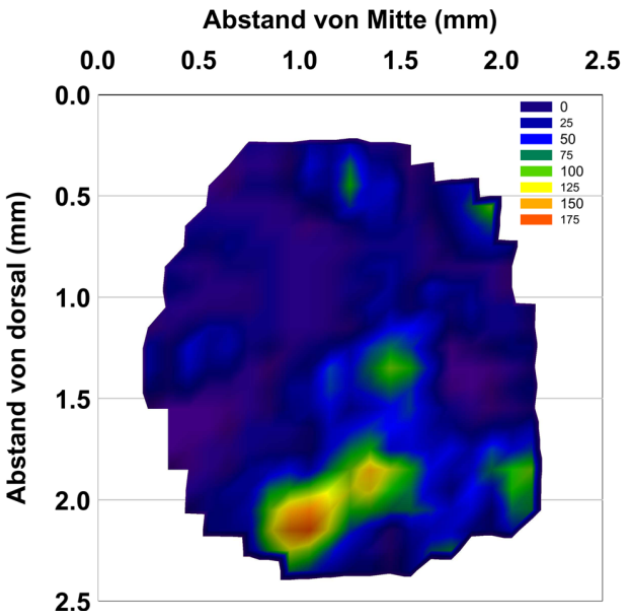


Abb. 2.5b: Der oben dargestellten Zellzählungs-Tabelle entsprechender IC von Tier 711 und ein daraus vergrößerter Ausschnitt, wie er zur Kontrolle von Bereichen verwendet wurde, wenn die Kontraste zwischen umliegendem Gewebe und GABAergen Zellen nicht stark genug waren, um die Zellen in den Ausdrucken eindeutig identifizieren zu können.

Nach der Konvertierung in die Zelldichte wurde mit Excel eine gleitende Mittelwertbildung, ein gängiges Verfahren zur Glättung von Daten, vorgenommen. Dabei wurde der Mittelwert aus jeder Tabellenzelle der Exceldatei und deren 8 unmittelbaren Nachbarn berechnet und mit 100 multipliziert. Da jedes Analysefeld $100 \times 100 \mu\text{m}$ groß war, ergab die Multiplikation mit 100 die lokale Zelldichte pro mm^2 . Für die spätere farbige Darstellung der lokalen Dichte GABAerger Zellen wurde in die außerhalb des IC gelegenen Rasterfelder der Dummy-Wert - 100 eingetragen (**Abb. 2.6**).

[illegible]

2.7 Zellvermessung zur Prüfung möglicher tonotoper Gradienten

Zur Prüfung eines tonotopen Gradienten in der Verteilung, der Querschnittsfläche und des Grauwerts (die als Maß für die Färbeintensität und damit dem Grad der GABA-Expression gelten) GABAerger Zellen im IC wurde ein Bereich in dorso-ventraler Ausdehnung festgelegt, in dem die einzelnen Zellen zusätzlich vermessen wurden. Hierfür wurde im Photoshop ein von einer vertikal durch den Mittelpunkt eines jeden ICs verlaufenden Linie fünf Rasterfelder (500 μm) nach lateral gehender Bereich ausgeschnitten und als separate TIF-Datei gespeichert (Abb. 2.4b, Bereich zwischen den roten Linien). Die Vermessung der in diesem Bereich liegenden GABAergen Zellen erfolgte dann mit dem Bildverarbeitungsprogramm Metamorph (Version 3.6). Die Zellen wurden dabei wenn möglich semiautomatisch per „Autotrace“ detektiert und nur bei Bedarf die Kontur mit dem Mauszeiger nachkorrigiert. So wurde für jede Zelle eine „region of interest“ (ROI) definiert. Zusätzlich wurden im mittleren Bereich der dorsoventralen Ausdehnung der Ausschnitte jeweils vier Rechtecke (je 100x400 Pixel) in einem Neuronen- und Gefäß-freien Bereich mit vermessen, um den Grauwert des Neuropils zu charakterisieren. Die ausgewählten, zu vermessenden Objekte wurden als ROI in einer eigenen Datei gespeichert und konnten für spätere Korrekturen und Fragestellungen jederzeit wieder in Form einer Schablone vor den entsprechenden Hintergrund gelegt werden (**Abb. 2.8**).

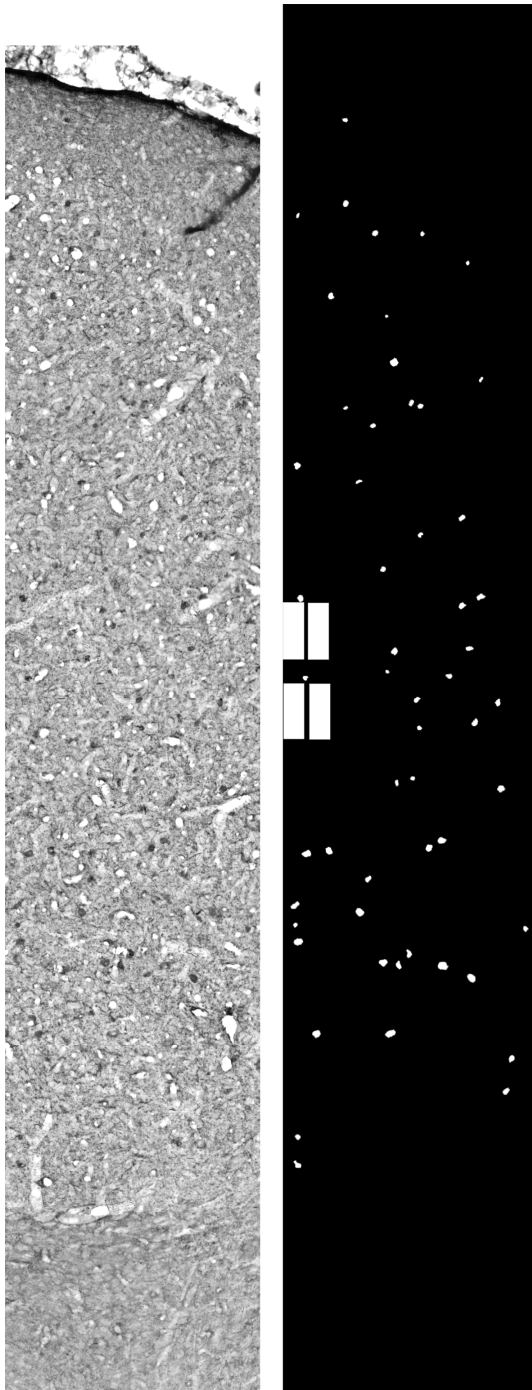


Abb. 2.8:

Linke Seite: der zur Untersuchung eines tonotopen Gradienten in der dorsoventralen Achse ausgewählte Bereich (Tier 711), in dem die GABAergen Zellen neben der Auszählung zusätzlich vermessen wurden.

Rechte Seite: Die detektierten GABAergen Zellen (helle Punkte) als „regions of interest“ (ROI) des IC von Tier 711, die in einer eigenen Datei gespeichert wurden und in Form der dargestellten Schablone bei späteren Fragestellungen über den untersuchten Bereich des entsprechend links dargestellten IC gelegt werden konnte.

Erst jetzt erfolgte die Messung mit zuvor ausgewählten Parametern (u.a. Anzahl der Pixel, durchschnittlicher Grauwert, Lage auf der x- bzw. y-Achse, Äquivalenzradius), dann wurden die Werte sämtlicher ROIs eines Ausschnittes als Textdatei abgespeichert, die für die weitere Analyse in Excel übernommen wurde. Gleichzeitig konnte die bei der Zellvermessung ermittelte Anzahl der in diesem Abschnitt liegenden GABAergen Neurone als Kontrolle der vorherigen Zellzählung im gesamten IC herangezogen werden. Hierfür wurde das Ergebnis der ersten Zellzählung in dem entsprechenden

Ausschnitt mit der unabhängig davon bei der Zellvermessung ermittelten Zellzahl in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (**Abb. 2.9**).

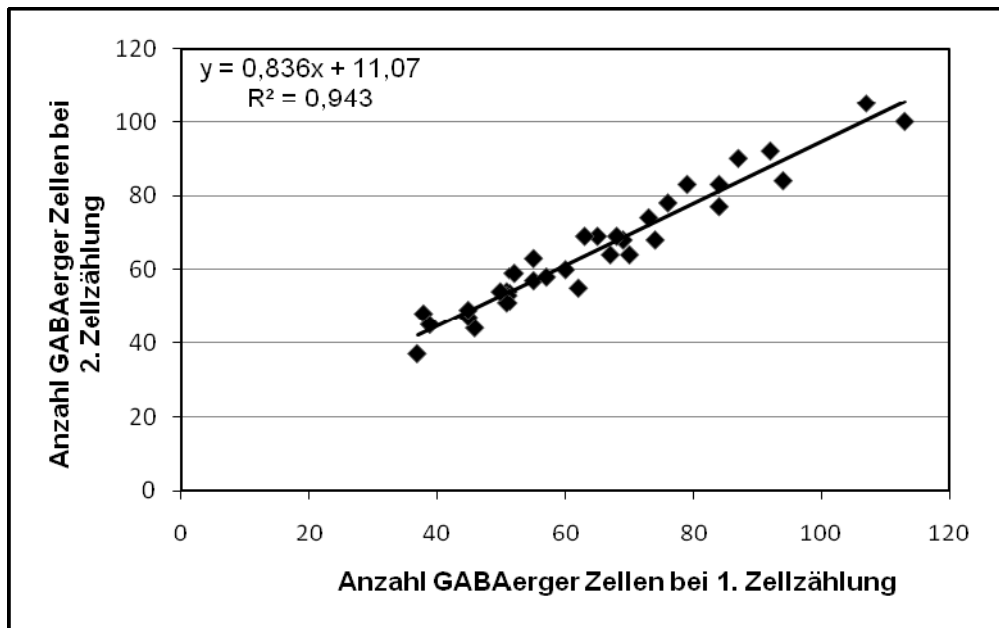


Abb. 2.9: Vergleich der ermittelten Zahlen GABAerger Zellen im detailliert untersuchten Bereich des IC. Ergebnisse der ersten Zellzählung (im Rahmen der Zählung GABAerger Zellen im gesamten IC) in Abhängigkeit von der bei der Zellvermessung erhobenen Zellzahl bei allen 34 Versuchstieren. Die Regressionsgerade ist schwarz dargestellt und zeigt den linearen, gleichsinnigen Zusammenhang zwischen den erhobenen Daten und die hohe Korrelation zwischen den beiden unabhängig durchgeführten Zählungen.

Die Steigung der Regressionsgeraden (0,84) liegt dabei nah am Wert eins einer entsprechenden 1:1 Diagonalen. Das Bestimmtheitsmaß r^2 beträgt 0,94 und besagt, dass 94% der Variation der 2. Zählung durch die Werte der ersten Zählung erklärt werden. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen beiden Zählungen ($p < 0,001$). Dies zeigt, dass die Bestimmung der Anzahl GABAerger Zellen sehr robust und reproduzierbar ist.

2.8 Graphische Darstellung und statistische Analyse

Die gesammelten Daten wurden in Tabellen archiviert und zur graphischen Darstellung mit dem Programm Excel 2000 (Fa. Microsoft) in Diagramme überführt. Die Koordinaten wurden funktionsabhängig beschriftet, die x-Achse als Rubrikenachse und die y-Achse als Größenachse. Je nach Merkmalen wurden die Ergebnisse dabei in Streu-

Säulen- oder Liniendiagrammen dargestellt. Für die statistische Auswertung und Analyse der Ergebnisse wurde das Programm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde vor Testbeginn auf einen in der Medizin üblichen Schwellenwert von $\alpha = 5\%$ festgelegt, das Signifikanzniveau in dieser Arbeit entspricht somit $p = 0,05$.

Neben der auf ein einzelnes Merkmal bezogenen Analyse von Daten war in dieser Studie vor allem von Interesse, den Zusammenhang zwischen verschiedenen Variablen zu betrachten. Anhand der Punktwolke, in der jeder Punkt die Messwerte einer bestimmten Beobachtungseinheit repräsentiert, kann man erkennen, ob ein solcher Zusammenhang annähernd linear ist. In diesem Fall lässt sich durch die Punktwolke eine Regressionsgerade legen, deren positive Steigung einen gleichsinnigen bzw. deren negative Steigung einen gegensinnigen Zusammenhang beschreibt.

Hierfür eignen sich die lineare Korrelation und deren Korrelationskoeffizient „r“ nach Pearson, der das lineare Verhältnis zweier Variablen x und y beschreibt. Der Korrelationskoeffizient kann dabei Werte zwischen - 1 (gegensinniger Zusammenhang) und + 1 (gleichsinniger Zusammenhang) annehmen. Ein Korrelationskoeffizient von 0 bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang besteht. Je näher „r“ bei - 1 oder + 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang (Lange und Bender, 2007; Weiß und Bauer, 2008).

Das Bestimmtheitsmaß „ r^2 “ ist ein Maß für den erklärten Anteil der Variabilität einer abhängigen Variabel durch ein statistisches Modell. Es kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Diese Zahl besagt, wie viel Prozent der Variabilität des Merkmals Y wirklich durch das Merkmal X bedingt sind - der Rest wäre dann auf andere Einflussfaktoren, die das vorliegende Modell nicht berücksichtigt, zurückzuführen (Yule, 1897; Weiß und Bauer, 2008). Das Bestimmtheitsmaß wurde z.B. herangezogen, um die Variabilität der Querschnittsfläche GABAerger Zellen von ventral nach dorsal im IC besser zuordnen zu können.

Weicht die Verteilung der Daten von der Normalverteilung ab, so eignet sich der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Der Begriff „monoton“ ist dabei umfassender als „linear“ und bedeutet, dass mit größer werdenden x-Werten auch f(x) ansteigt (bei einem gleichsinnigen Zusammenhang) und umgekehrt, dass f(x) abfällt, wenn x größer wird (bei einem gegensinnigen Zusammenhang). Der Spearman Korrelationskoeffizient berücksichtigt nicht die Original-Messwerte, sondern nur deren Rangzahlen. Er nimmt, wie der Koeffizient nach Pearson, Werte zwischen 1 und - 1 an und ist analog zu diesem

interpretierbar (Weiß und Bauer, 2008). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wurde in dieser Arbeit häufig verwendet, zum Beispiel um den Einfluss des (nicht normalverteilten) Alters der Versuchstiere auf die untersuchten Messparameter zu evaluieren.

Der Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) ist ein parameterfreier Homogenitätstest und wird verwendet, um zu überprüfen, ob die Übereinstimmung zweier unabhängiger Variablen signifikant ist, und somit zwei unabhängige Verteilungen A und B zu einer Grundgesamtheit gehören (Mann und Whitney, 1947; Weiß und Bauer, 2008). Neben der Spearman Rangkorrelation fand der MWU-Test Anwendung, um signifikante Unterschiede zwischen den Messparametern der Gruppen von jungen und alten Tieren herauszufinden.

Um einen Zusammenhang zwischen mehr als zwei Merkmalen zu analysieren, müssen komplexere Verfahren wie die Varianzanalyse angewendet werden. Dabei wird getestet, ob die Varianz zwischen zwei Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. So kann beispielsweise gezeigt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht. In dieser Arbeit wurde auf diese Art und Weise geprüft, ob die Unterschiede der Zell-Querschnittsflächen zwischen den dorsoventralen Positionen im IC und den Altersgruppen trotz erheblicher Streuungen signifikant sind.

3. Ergebnisse

Die Erhebung der Daten geschah „blind“ ohne Kenntnis von Alter und einer möglichen Hörstörung, um auch eine unbewusste Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen. Deshalb wurde erst nach Beendigung der Datenerfassung das Alter und eine eventuelle Mittelohr- oder Gehörgangentzündung den 34 ausgewählten Gerbils zugeordnet. Es wurden 7 junge (unter einem Jahr, im Mittel 4,5 Monate alt) und 18 alte Tiere (im Mittel 43,3 Monate alt) mit normalem Hörstatus untersucht. Bei 9 Tieren lag eine Mittelohrentzündung, ein verstopfter Gehörgang oder ein Cholesteatom vor. Dabei war bei 6 Tieren die selbe Seite betroffen deren IC analysiert wurde (ipsilateral), bei 2 Tieren war die dem untersuchten IC gegenüberliegende Seite (contralateral) von der Hörstörung betroffen, und bei einem Tier lag eine bilaterale Hörstörung vor.

Im Folgenden soll auf drei Themenbereiche eingegangen werden: Zunächst werden die möglichen Alterseffekte auf die Morphologie des IC aufgeführt, hier wird die statistische Analyse auf den Vergleich der normal hörenden jungen und alten Tiere beschränkt, da die Anzahl der untersuchten Tiere mit ipsi-, contra- und bilateral beeinträchtigtem Hörvermögen für eine statistische Analyse nicht ausreichend ist. Des Weiteren soll beantwortet werden, ob es entlang der dorso-ventralen Achse des IC Gradienten bei den untersuchten Messparametern gibt. Zuletzt wird die mögliche Auswirkung der ipsi-, contra- und bilateralen Hörstörung und hier insbesondere deren Einfluss auf die lokale Dichte GABAerger Zellen im IC dargestellt.

3.1 Analyse möglicher Alterseffekte

Die wichtigste Fragestellung dieser Arbeit zielt auf mögliche Veränderungen ab, die der Alterungsprozess im Colliculus inferior der Wüstenrennmaus verursacht. Im Folgenden Abschnitt soll aufgezeigt werden, ob es messbare Unterschiede bei den untersuchten Parametern junger und alter Tiere gibt.

3.1.1 Querschnittsfläche, Breite und Höhe des IC

In **Abb. 3.1** hat es den Anschein, dass die Querschnittsfläche des IC der jungen Tiere (Mittelwert: 3,62 mm²) über dem der alten Tiere (Mittelwert: 3,14 mm²) liegt. Der Mittelwert ist bei alten Tieren 13,1 % niedriger als bei jungen Tieren. In der

statistischen Überprüfung bestätigt die Spearman Rangkorrelation hier einen Trend für die Abnahme der IC-Querschnittsfläche mit zunehmendem Alter ($r = -0,345$, $p = 0,091$). Der MWU-Gruppenvergleich (Mann-Whitney-U-Test) ergibt eine signifikant reduzierte Querschnittsfläche in der Gruppe der alten Tiere ($p = 0,017$). Die statistische Auswertung gibt also klare Hinweise darauf, dass es zu einer altersbedingten Abnahme der IC-Querschnittsfläche kommt.

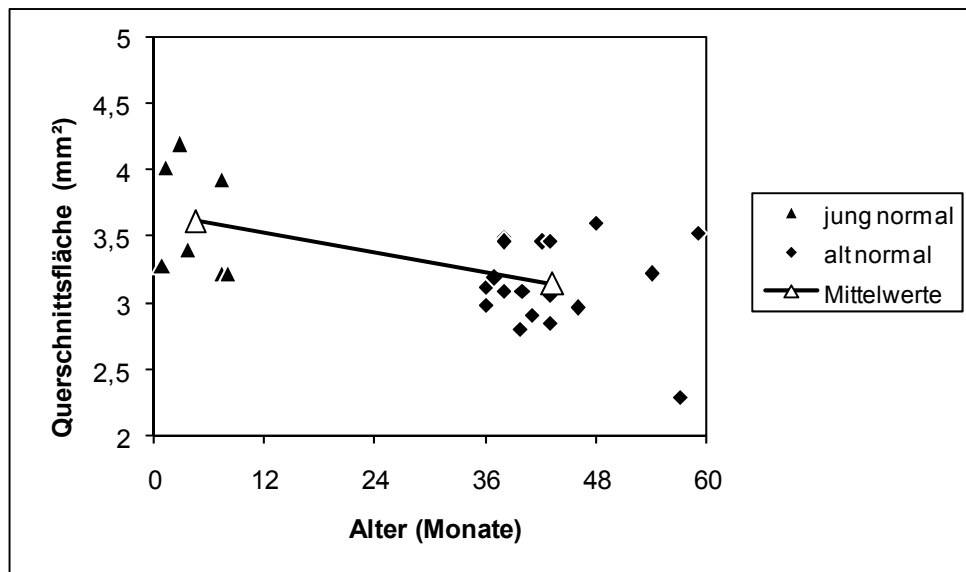


Abb. 3.1: Die Querschnittsfläche (mm²) des IC als Funktion des Alters (Monate) der Tiere.

Die Gruppenmittelwerte junger und alter Tiere sind als weiße Dreiecke dargestellt und durch die schwarze Linie miteinander verbunden.

Auch die Breite (mediolaterale Ausdehnung) des IC ist bei jungen Tieren im Mittel höher, obwohl sich die Werte, wie in **Abb. 3.2** sichtbar wird, nur geringfügig unterscheiden (Mittelwert jung: 2,10 mm; Mittelwert alt: 2,00 mm), der Mittelwert in der Gruppe der alten Tiere liegt nur 4,8 % unter dem der jungen Tiere. Die Spearman Rangkorrelation belegt dennoch eine signifikante Abnahme der IC-Breite mit zunehmenden Alter ($r = -0,466$, $p = 0,019$). Im Gegensatz dazu ergab der MWU-Gruppenvergleich keine signifikant reduzierte IC-Breite in der Gruppe der alten im Vergleich zu der Gruppe der jungen Tiere ($p = 0,158$).

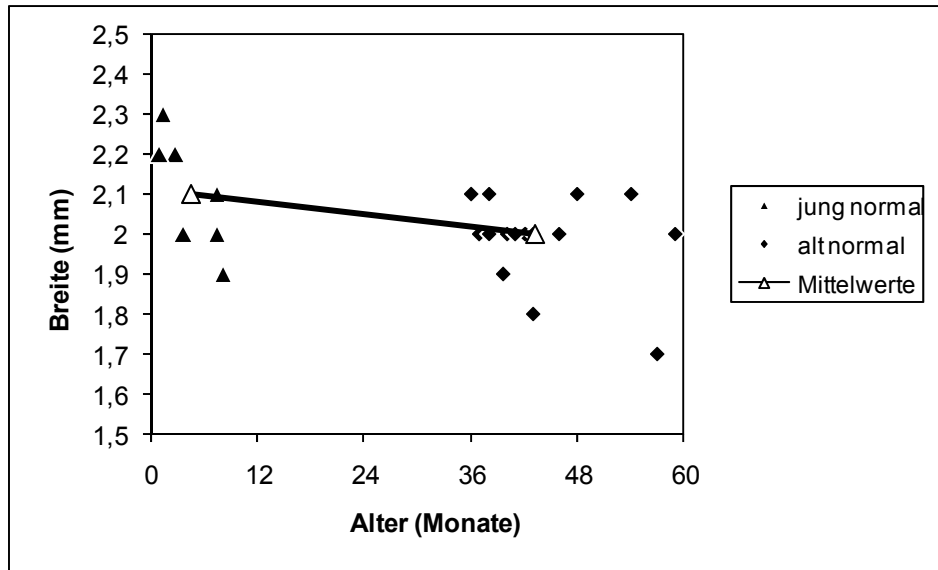


Abb. 3.2: Darstellung der Breite (mm) des IC in Abhängigkeit vom Alter (Monate) der Tiere. Die schwarze Linie verbindet die Gruppenmittelwerte (weiße Dreiecke) junger und alter Tiere miteinander.

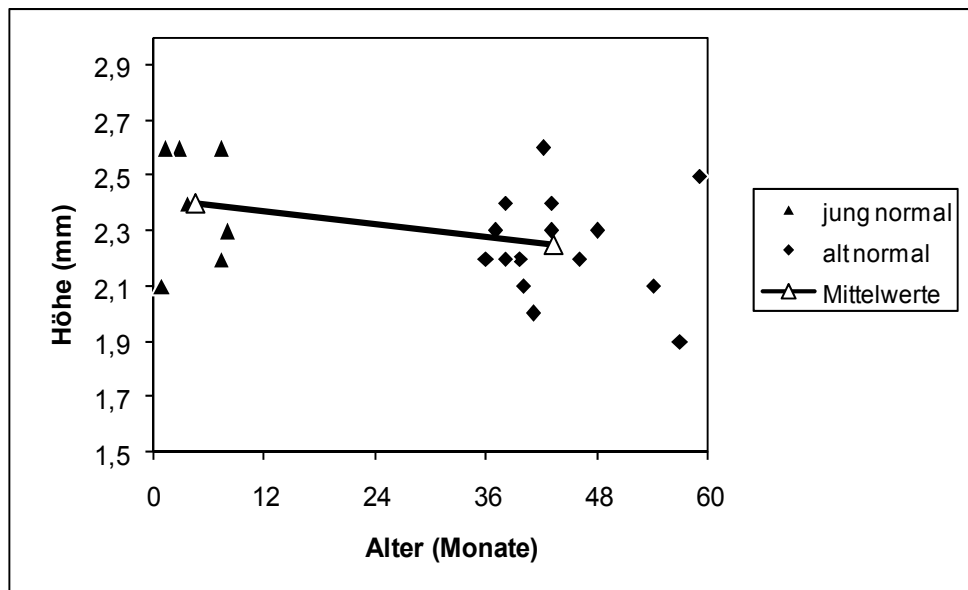


Abb. 3.3: Die Höhe (mm) des IC in Abhängigkeit vom Alter (Monate) der Tiere. Die Gruppenmittelwerte junger und alter Tiere sind als weiße Dreiecke dargestellt und durch die schwarze Linie miteinander verbunden.

Die Höhe (dorsoventrale Ausdehnung) des IC scheint in **Abb. 3.3** im Mittel bei jungen Tieren etwas höher (2,40 mm) als bei alten (2,25 mm). Dies bedeutet, dass der Gruppenmittelwert der alten Tiere um 6.3 % unter dem der jungen Tiere liegt. Hier ergibt die Spearman Rangkorrelation keine signifikante Abnahme der IC-Höhe mit zunehmendem Alter ($r = -0,210$, $p = 0,313$). Auch der MWU-Gruppenvergleich ergibt keine signifikant reduzierte Höhe in der Gruppe der alten Tiere ($p = 0,125$). Die altersbedingte Abnahme der Höhe des IC kann in dieser Stichprobe also nicht statistisch abgesichert werden.

Auch wenn die Abnahme der mittleren Höhe und Breite des IC bei alten Tieren mit 5-6 % nur gering ausfällt und jeweils für sich in der untersuchten Stichprobe nicht signifikant war, sind die Ergebnisse mit der Abnahme der Querschnittsfläche kompatibel, da es sich jeweils um lineare Maße handelt. Berechnet man aus den Mittelwerten von Breite und Höhe des IC als erste Näherung für die Querschnittsfläche die Fläche einer Ellipse so ergeben sich 3,97 mm² für junge und 3,54 mm² für alte Tiere. Diese Werte sind etwas höher als die tatsächlich ermittelten Querschnittsflächen. Die durch diese Abschätzung ermittelten Werte entsprechen einer Abnahme der Ellipsen-Querschnittsfläche von 10,8 % und kommen dem tatsächlich gemessenen Wert von 13,1 % nahe.

3.1.2 Anzahl GABAerger Neurone

In **Abb.3.4** ergibt sich im Mittel eine etwas höhere Anzahl GABAerger Neurone bei alten Tieren (Mittelwert jung: 145, Mittelwert alt: 166). Eine Spearman Rangkorrelation (wegen der inhomogenen Altersverteilung ist eine lineare Korrelation nicht zulässig) ergibt keinen signifikanten Alterseffekt ($N = 25$; $r = 0,391$; $p = 0,120$). Bei einem MWU-Gruppenvergleich ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen jungen ($N = 7$) und alten ($N = 18$) Tieren ($p = 0,178$). Obwohl die Grafik zunächst den Anschein erweckt und die mittlere Anzahl GABAerger Neurone bei alten Tieren um fast 15 % höher als bei jungen Tieren liegt, war diese Zunahme in der vorliegenden Stichprobe statistisch nicht signifikant. Dieser Befund weist aber deutlich darauf hin, dass es im IC alter Gerbils nicht zu einem Verlust GABAerger Neurone kommt.

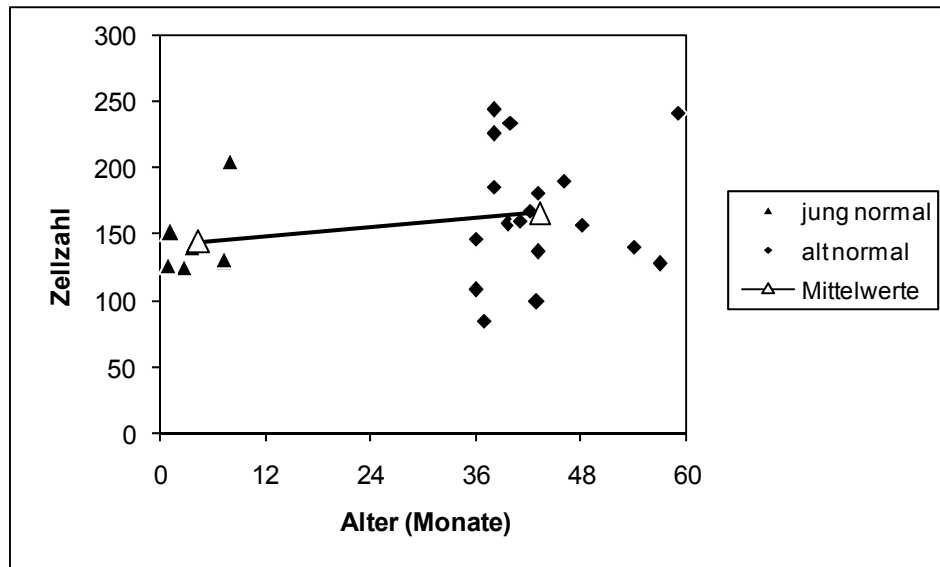


Abb. 3.4: Anzahl GABAerger Neurone in Abhängigkeit vom Alter (Monate). Die schwarze Linie verbindet die Gruppenmittelwerte (weiße Dreiecke) junger und alter Tiere miteinander.

Um zu überprüfen, ob in einem IC-Schnitt mit großer Querschnittsfläche mehr GABAerge Zellen vorhanden sind als in einem mit kleiner Querschnittsfläche, wurde die entsprechende Korrelation untersucht (**Abb. 3.5**).

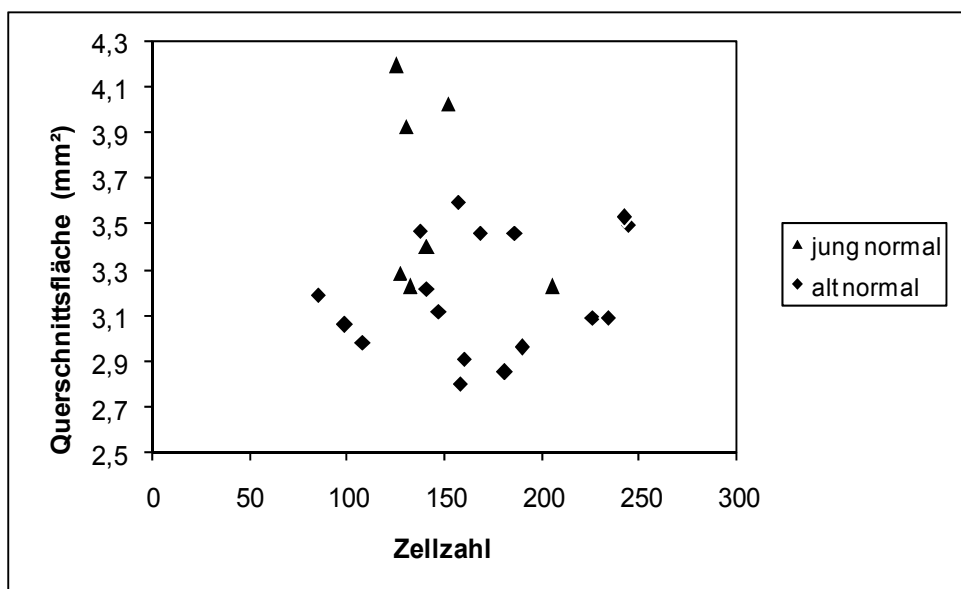


Abb. 3.5: IC-Querschnittsfläche (mm²) in Abhängigkeit von der Zahl GABAerger Neurone im IC junger (Dreiecke) und alter Tiere (Rauten).

Es wird deutlich, dass es keinerlei systematischen Zusammenhang zwischen beiden Parametern gibt. Sowohl die lineare Korrelation ($r = 0,011$, $p = 0,958$) als auch eine

Spearman Rangkorrelation ($r = 0,016$, $p = 0,939$) bestätigen den fehlenden Zusammenhang zwischen Fläche und Zellzahl. Die im Mittel geringere IC-Querschnittsfläche bei den alten Tieren ist also nicht mit einer parallelen Abnahme der Anzahl der GABAergen Neurone korreliert.

3.1.3 Dichte GABAerger Neurone

Ein weiteres Maß für die Beschreibung des GABAergen Systems ist die Dichte der GABAergen Neurone im IC. In **Abb. 3.6** zeigt sich eine erhöhte Dichte GABAerger Zellen im IC alter Tiere. Hier ergibt sich tatsächlich (konsistent mit den Daten zu einer im Mittel reduzierten Querschnittsfläche und einer im Mittel erhöhten Zellzahl bei alten Tieren) eine Zunahme von 30 % bei alten (Mittelwert: 52,98 pro mm^2) im Vergleich zu den jungen (Mittelwert: 40,69 pro mm^2) Tieren. Die Spearman Rangkorrelation bestätigt eine signifikante Zunahme der Dichte GABAerger Neurone mit zunehmendem Alter ($r = 0,446$, $p = 0,025$). Auch der MWU- Gruppenvergleich ergibt eine signifikante Zunahme der Dichte GABAerger Zellen in der Gruppe der alten Tiere ($p = 0,041$).

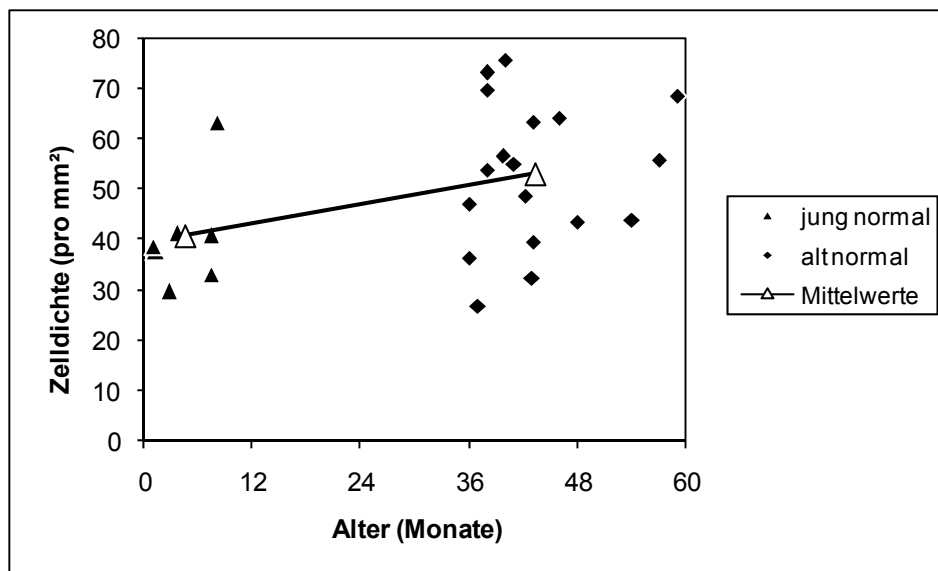


Abb. 3.6: Zelldichte (pro mm^2) im IC in Abhängigkeit vom Alter (Monate) der Tiere. Die schwarze Linie stellt die Verbindung zwischen den Gruppenmittelwerten junger und alter Tiere dar.

Durch die Anfertigung farbiger Karten der lokalen Dichte GABAerger Neurone sollte deren Verteilung innerhalb des IC-Querschnitts veranschaulicht werden.

Wie in **Abb. 3.7** zu sehen ist, zeigt die Verteilung der GABAergen Neurone im IC bei allen untersuchten Tieren, trotz inter-individueller Variabilität, ein charakteristisches Muster. Ein Band mit einer hohen Dichte GABAerger Neurone zieht bei jungen und alten Tieren in der lateralen Hälfte des IC von dorsal nach ventral. Die geringste Dichte GABAerger Zellen findet sich bei den meisten Tieren im dorso-medialen Bereich und in einem schmalen lateralen Streifen des IC. Konsistent mit der Zunahme der mittleren Zelldichte bei alten Tieren wie sie in Abb. 3.6 dargestellt ist, erscheint der Flächenanteil mit höherer Zelldichte (hellblaue-grün-gelbliche Bereiche) bei alten im Vergleich zu den jungen Tieren erhöht.

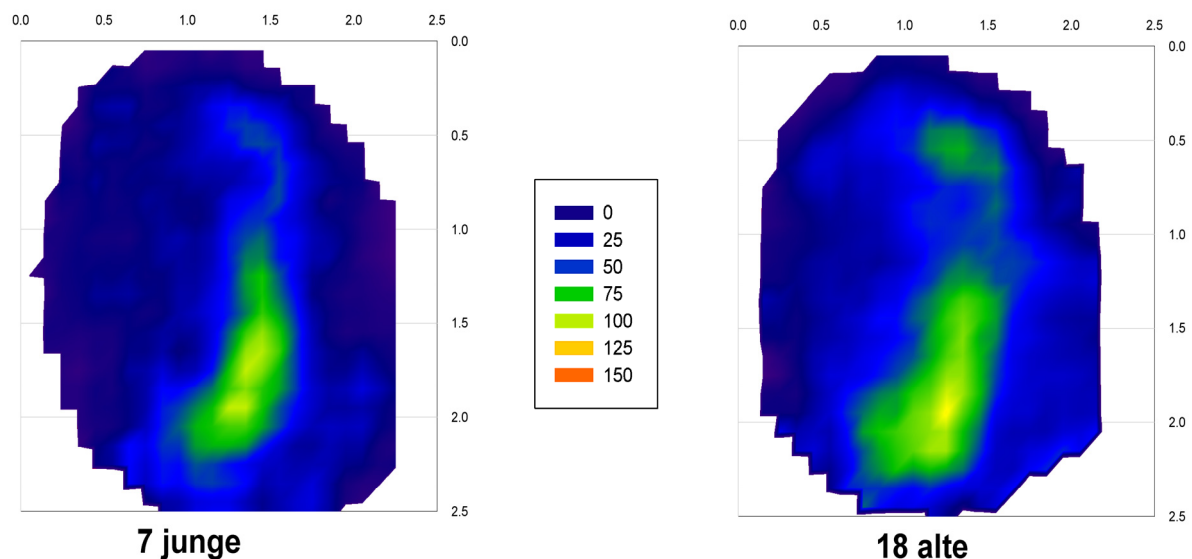


Abb. 3.7: Lokale Dichte GABAerger Neurone (pro mm^2) im IC gemittelt über junge ($N = 7$) und alte ($N = 18$) Tiere. Über den Abbildungen ist jeweils die Distanz von der medialen; rechts der Abbildungen die Distanz von der dorsalen Begrenzung des IC in Millimetern angegeben. Die Farbcodierung ist in der Legende zwischen beiden Abbildungen dargestellt und wird in Schritten von 25 Zellen/ mm^2 abgestuft.

Dies belegt auch eine quantitative Analyse der Bereiche der Querschnittsfläche, deren Dichte über 40,7 Zellen pro mm^2 (dem als Norm gewählten Mittelwert der mittleren Dichte bei jungen Tieren) lag.

In **Abb. 3.8** ist links der prozentuale Anteil der Querschnittsfläche mit einer Dichte über 40,7 GABAergen Zellen pro mm^2 und rechts der Flächenanteil in mm^2 als Funktion des Alters dargestellt. In beiden Fällen sind die Mittelwerte der alten Tiere (52,8 %; 1,66 mm^2) über denen der jungen Tiere (37,5 %; 1,32 mm^2). Obwohl die statistische Analyse in der vorliegenden Stichprobe nur für den prozentualen Flächenanteil (Spearman Rangkorrelation: $r = 0,43$, $p = 0,032$; MWU: $p = 0,041$) und nicht für die absolute Fläche mit einer Dichte über 40,7/ mm^2 signifikant war (Spearman Rangkorrelation: $r = 0,30$, $p = 0,144$; MWU: $p = 0,141$) stehen diese Befunde im Gegensatz zu Hypothesen die von einer Abnahme der GABAergen Neurone im IC mit zunehmendem Alter ausgehen.

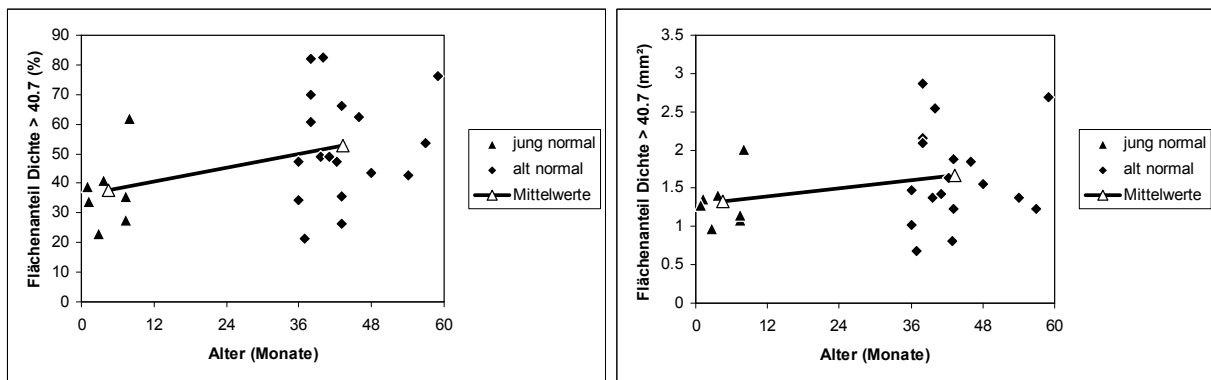


Abb. 3.8: Flächenanteil mit einer Dichte über 40,7 in Prozent (links) und Flächenanteil mit einer Dichte über 40,7 in mm^2 (rechts) von GABAergen Zellen im IC in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

3.1.4 Detaillierte Analyse einzelner Zellen (mittlere Querschnittsfläche GABAerger Neurone, mittlerer Grauwert des Neuropils, mittlerer Grauwert der Zellen)

Für die detaillierte Analyse einzelner Zellen wurde ein 0,5 mm breiter Streifen medial von der Mittellinie eines jeden IC ausgewertet (wie Abb. 2.4 in „Material und Methoden“ zeigt). Zunächst soll dargestellt werden, welcher Anteil des gesamten IC dadurch genauer untersucht werden konnte.

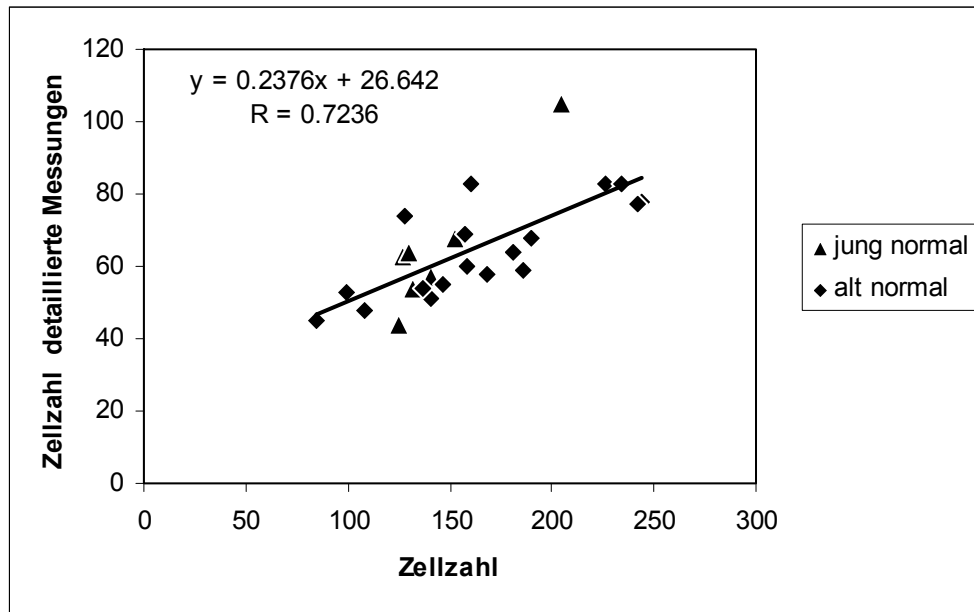


Abb. 3.9: Anzahl der Zellen, die durch die detaillierte Analyse erfasst wurden, als Funktion der Anzahl GABAerger Zellen im gesamten IC. Die Regressionsgerade ist schwarz dargestellt und zeigt den linearen, gleichsinnigen Zusammenhang zwischen den erhobenen Daten, oben links sind die Gleichung der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient (R) angegeben.

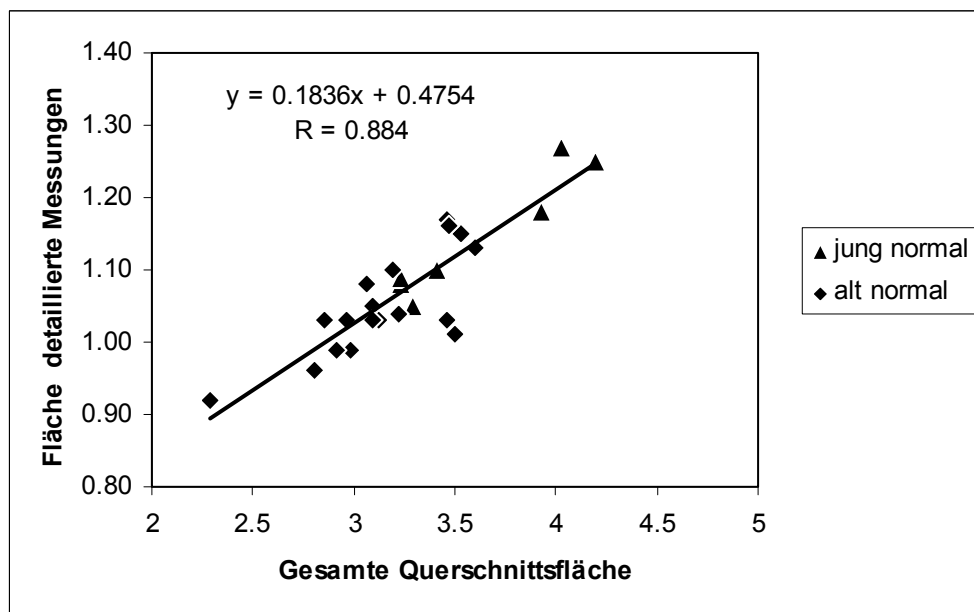


Abb. 3.10: Die detailliert analysierte Fläche (in mm²) als Funktion der gesamten IC Querschnittsfläche (in mm²). Die schwarze Linie stellt die Regressionsgerade dar, die nah um sie gestreuten Punkte zeigen den starken Zusammenhang zwischen den erhobenen Daten.

Abb. 3.9 zeigt, dass die gesamte Zahl der GABAergen Zellen und die Anzahl der in dem oben beschriebenen, ausgewählten Bereich des IC gelegenen Zellen korrelieren ($p < 0,001$). Die schwarze Linie zeigt die lineare Regression durch die Daten, zusätzlich sind die Gleichung der zugehörigen Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient angegeben. Im Mittel wurden 40,3% der gesamten GABAergen Zellen des IC für die detaillierte Analyse erfasst.

Wie in **Abb. 3.10** dargestellt, korrelieren auch die Querschnittsflächen des gesamten IC-Querschnitts mit der Fläche der für die detaillierte Analyse ausgewählten Bereiche. Die mittlere gesamte Querschnittsfläche des IC beträgt dabei 3,28 mm², die Querschnittsfläche der ausgewählten Bereiche 1,08 mm². Der Flächenanteil, der detailliert untersucht wurde betrug damit im Mittel 32,9 %.

Abb. 3.11 zeigt, dass die Zelldichte im gesamten IC (49,5 = Mittelwert aller normal hörenden alten und jungen Tiere) und die im detailliert analysierten Teilgebiet (60,6 = Mittelwert aller normal hörenden alten und jungen Tiere) korreliert. Im detailliert untersuchten Bereich liegt sie deutlich höher (22,3 %) als im gesamten IC. Dies entspricht der charakteristischen Verteilung GABAerger Neurone im IC, wie es in Abb. 3.7 dargestellt wurde, und beruht darauf, dass für die detaillierte Analyse ein Bereich mit einer hohen Zelldichte gewählt wurde.

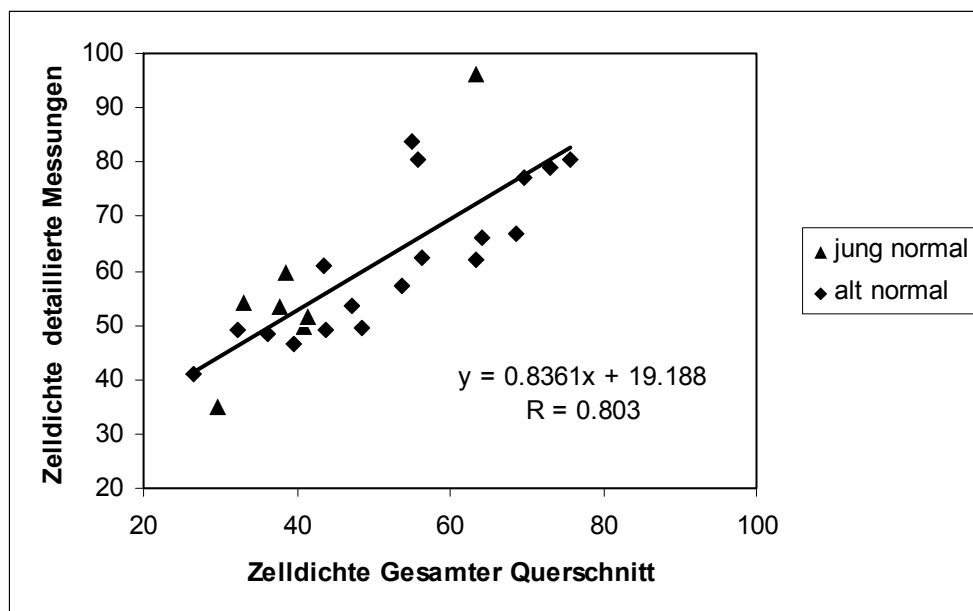


Abb. 3.11: Die Zelldichte (pro mm²) im detailliert analysierten Bereich im Verhältnis zur Zelldichte (pro mm²) im gesamten IC. Die Regressionsgerade ist schwarz dargestellt und zeigt die lineare Regression durch die erhobenen Daten. Unten rechts sind die Gleichung der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient (R) angegeben.

Im Folgenden wird nun auf die Ergebnisse der Analyse möglicher Alterseffekte auf die mittlere Querschnittsfläche GABAerger Neurone, den mittleren Grauwert des Neuropils und den mittleren Grauwert GABAerger Zellen im detailliert untersuchten Streifen des IC eingegangen. Hierbei wurden die Grauwerte (wie unter Punkt 2.7 im Teil „Material und Methoden“ beschrieben) als Maßstab für die Färbeintensität von Neuropil und Neuronen und damit für die Expression von GABA verwendet. Niedrige Grauwerte entsprechen einer hohen Färbeintensität und entsprechend einer hohen GABA-Expression.

Abb. 3.12 zeigt die mittlere Querschnittsfläche der GABAergen Neurone als Funktion des Alters. Hier lag der Mittelwert bei jungen ($153,2 \mu\text{m}^2$) etwas höher als bei alten Tieren ($143,9 \mu\text{m}^2$). Bei alten Tieren war die mittlere Querschnittsfläche also um 6,1 % im Vergleich zu jungen Tieren reduziert. Weder die Spearman Rangkorrelation ($r = 0,230$, $p = 0,269$) noch der MWU-Test ($p = 0,657$) können in der hier untersuchten Stichprobe einen signifikanten altersbedingten Unterschied der Zell-Querschnittsfläche nachweisen.

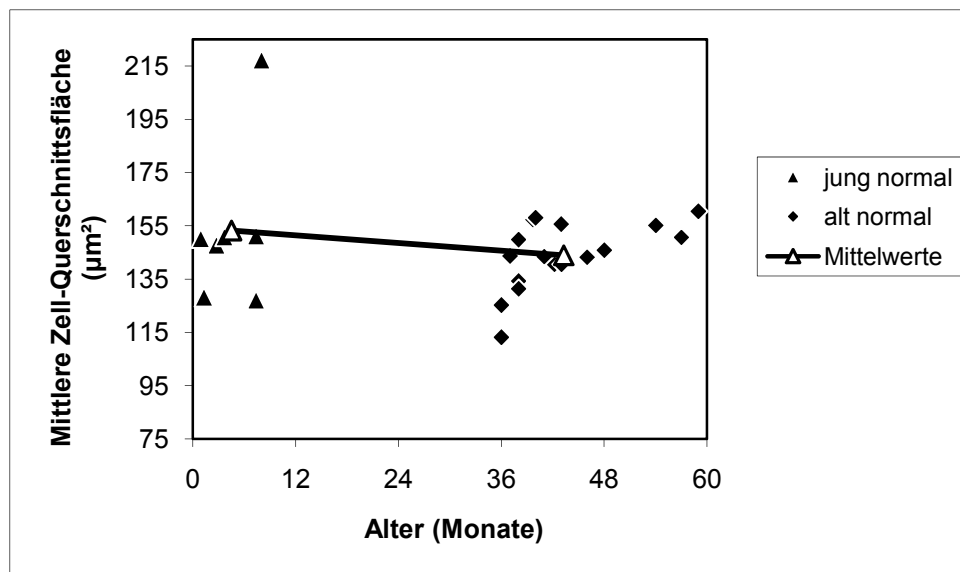


Abb. 3.12: Die mittlere Zell-Querschnittsfläche (μm^2) in Abhängigkeit vom Alter (Monate) der Tiere. Die Gruppenmittelwerte sind durch die schwarze Linie und die beiden dadurch verbundenen weißen Dreiecke dargestellt.

Der mittlere Grauwert des Neuropils wurde in vier Teilflächen ohne Neurone und Blutgefäße im Zentrum eines jeden IC ermittelt (siehe auch unter 2.7 in „Material und Methoden“). Er zeigt bei den alten und jungen Tieren eine deutliche inter-individuelle Variabilität, wobei die Werte von unter 100 (sehr dunkel) bis fast 240 (sehr hell) gehen.

Man könnte deshalb meinen, dass bei den besonders hellen Schnitten die Färbung nicht richtig funktioniert hat, beziehungsweise dass bei den schwach gefärbten Schnitten nur ein Teil der GABAergen Zellen zu erkennen waren. Dagegen spricht folgende Grafik in der die Anzahl GABAerger Zellen in Abhängigkeit vom Grauwert des Neuropils dargestellt wurde (**Abb. 3.13**):

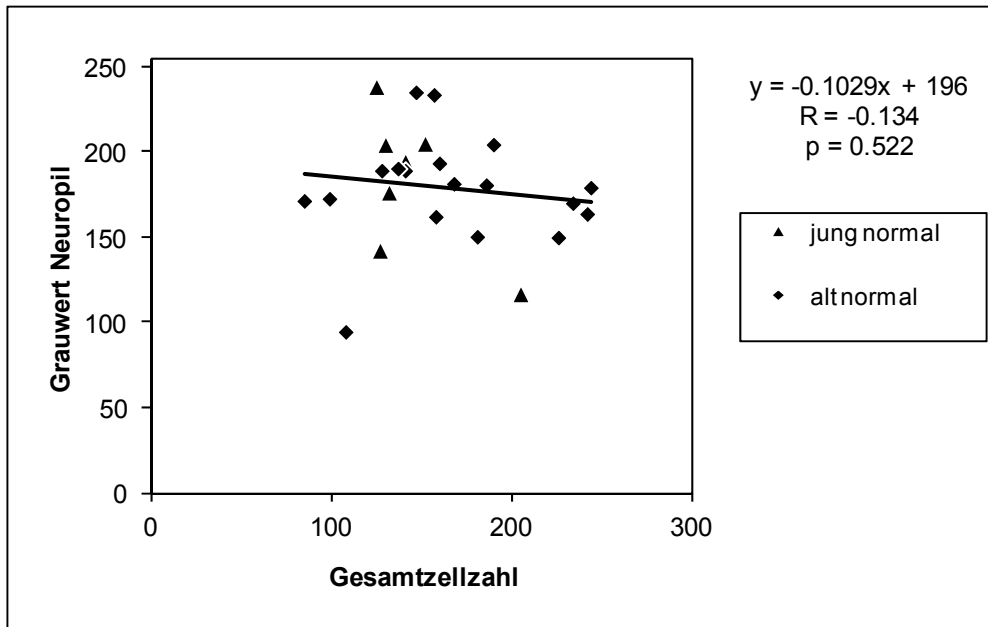


Abb. 3.13: Der Grauwert des Neuropils als Funktion der Gesamtanzahl GABAerger Zellen. Die lineare Regressionsgerade ist schwarz dargestellt.

Obwohl die schwarze lineare Regressionslinie mit der negativen Steigung darauf hindeutet, dass bei geringer Färbeintensität (hohe Grauwerte) auch weniger Zellen zu erkennen sein könnten, belegt schon die geringe Steigung von - 0,1029, dass der Einfluss sehr gering ist. Darüber hinaus zeigt die statistische Analyse keine signifikante Korrelation zwischen der Zahl GABAerger Zellen und der Färbeintensität, also dem Grauwert im Neuropil (lineare Regression, $r = - 0,134$, $p = 0,522$).

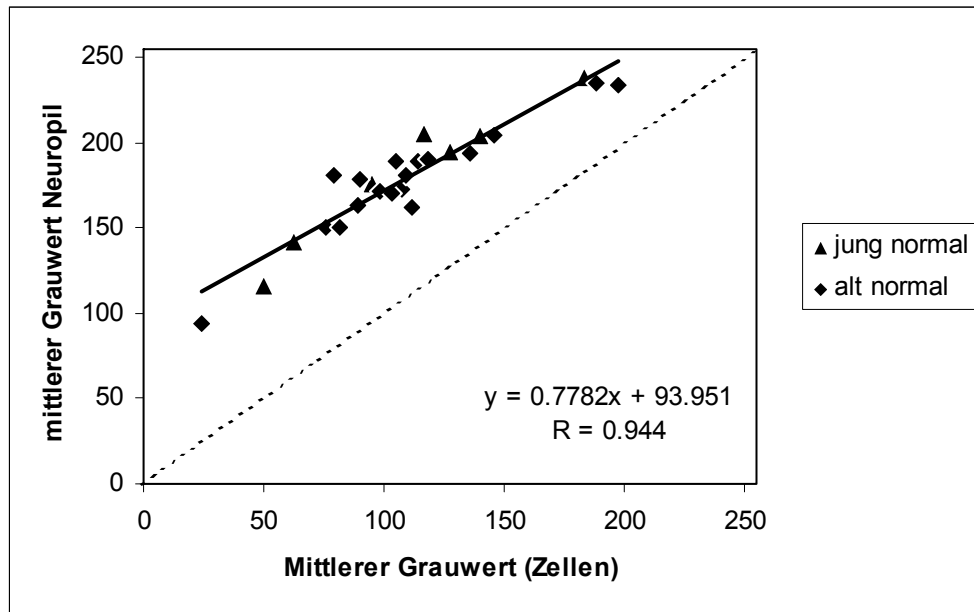


Abb. 3.14: Der mittlere Grauwert des Neuropils als Funktion des mittleren Grauwerts der GABAergen Zellen im detailliert untersuchten Bereich des IC. Die durchgezogene Linie stellt die Regressionsgerade dar. Die gestrichelte Linie entspräche einer absoluten Übereinstimmung der Grauwerte von Neuropil und Zellen.

Die schwarze durchgezogene Linie in **Abb. 3.14** zeigt die lineare Regressionsgerade und belegt eine hochsignifikante Korrelation der Färbeintensität von Neuropil und Neuronen ($p < 0,001$). Die gestrichelte Linie entspricht dem Fall, dass Neuropil und Zellen dieselben Grauwerte hätten. Die Differenz zwischen der gestrichelten Linie und der Regressionsgeraden zeigt, dass die Grauwerte der Neurone im Mittel um 50-90 Stufen höher als die des Neuropils liegen, die markierten Neurone also deutlich dunkler als das umgebende Neuropil erscheinen. Die Korrelation verdeutlicht, dass in einem „hellen“ Schnitt sowohl die Neurone als auch das Neuropil „hell“ sind.

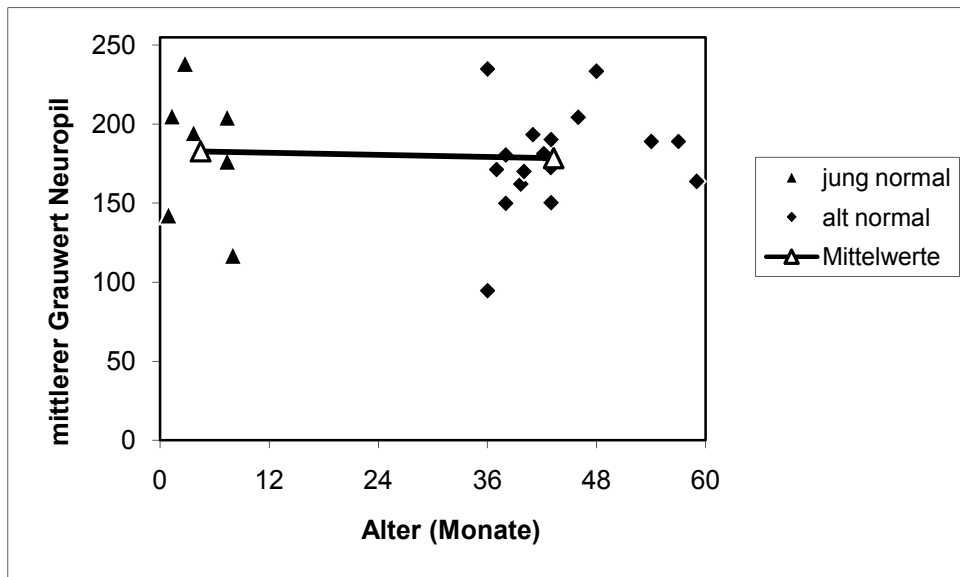


Abb. 3.15: Der mittlere Grauwert des Neuropils in Abhängigkeit des Alters (Monate). Die Gruppenmittelwerte junger und alter Tiere sind als weiße Dreiecke dargestellt und durch die schwarze Linie miteinander verbunden.

Zur Darstellung möglicher Effekte des Alters auf den mittleren Grauwert des Neuropils dient **Abb. 3.15**. Es zeigt sich hier kein Hinweis auf einen deutlichen Unterschied im mittleren Grauwert des Neuropils zwischen jungen (Mittelwert: 182,6) und alten (Mittelwert: 178,3) Tieren, der Wert lag bei alten Tieren im Mittel um 2,4 % unter dem der jungen Tiere, womit die untersuchten Bereiche bei alten Tieren im Mittel geringfügig dunkler waren. Auch die statistische Auswertung ergab weder für die Spearman Rangkorrelation ($r = -0,014$, $p = 0,946$) noch für den MWU- Gruppenvergleich ($p = 0,495$) einen Anhalt für einen signifikanten altersbedingten Unterschied. Wenn man den Grauwert als Maß für die Färbeintensität und den Grad der GABA-Expression nimmt, dann ergibt dieser Befund keinen Hinweis auf eine signifikante Abnahme der GABA-Expression im Neuropil des IC bei alten Tieren, der sich in einer Zunahme des Grauwerts zeigen würde

Die folgende Grafik (**Abb. 3.16**) zeigt den mittleren Grauwert der GABAergen Neurone als Funktion des Alters. Auch diese Grafik zeigt eine relativ hohe Variabilität der Färbeintensität sowohl bei den alten als auch bei den jungen Tieren. Der Mittelwert bei jungen (110,7) und alten (109,7) Tieren ist fast identisch und liegt im Mittel bei den alten Tieren nur um 0,9 % unter dem der jungen. Die statistische Analyse (Spearman Rangkorrelation, $r = 0,070$, $p = 0,740$; MWU: $p = 0,883$) belegt, dass das Alter keinen signifikanten Einfluss auf den Grauwert der Neurone hat.

Auch dieser Befund gibt keinen Hinweis auf eine Abnahme der GABA-Expression in Neuronen des IC bei alten Tieren.

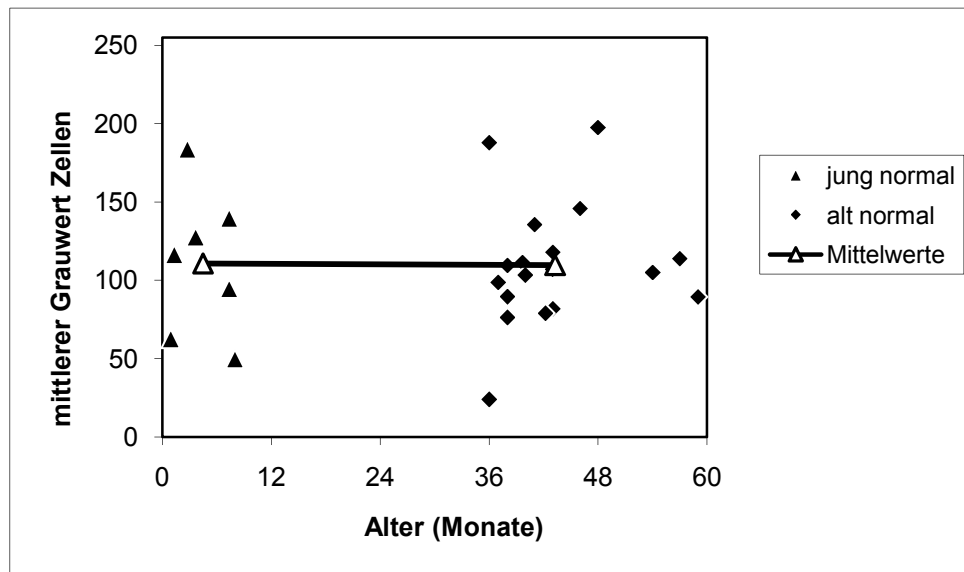


Abb. 3.16: Der mittlere Grauwert GABAerger Zellen als Funktion des Alters (Monate). Die Gruppenmittelwerte junger und alter Tiere werden durch die beiden weißen Dreiecke dargestellt, die nahezu in der Horizontalen verlaufende schwarze Verbindungslinie weist bereits auf einen sehr geringen Einfluss des Alters auf den mittleren Grauwert der Zellen hin.

Zusammenfassend zeigen die Befunde der Analyse möglicher Alterseffekte, dass bei alten im Vergleich zu jungen Tieren eine geringfügig (15%), aber nicht signifikant höhere Anzahl GABAerger Zellen vorlag (Abb. 3.4). Die GABAergen Neurone bei alten Tieren wiesen im Mittel eine geringfügig (6%), aber im Vergleich zu jungen Tieren nicht signifikant reduzierte Querschnittsfläche auf (Abb. 3.12). Die mittleren Grauwerte des Neuropils und der GABAergen Neurone alter Tiere waren im Vergleich zu jungen Tieren etwas geringer (2,4 bzw. 0,9%, siehe Abb. 3.15; 3.16). Diese Unterschiede waren nicht signifikant und würden bei alten Tieren eher auf eine höhere Färbeintensität und damit GABA-Expression als auf einen Verlust von GABA hinweisen. Da die Querschnittsfläche des IC bei alten im Vergleich zu jungen Tieren signifikant geringer war (13,1%, siehe Abb. 3.1) ergaben sich auch signifikant höhere Dichten GABAerger Neurone im IC alter Tiere (Abb. 3.6-3.8).

Insgesamt weisen diese Befunde auf marginale altersbedingte Änderungen der Expression von GABA im IC von Wüstenrennmäusen hin und unterscheiden sich damit deutlich von den diesbezüglich für Ratten publizierten Daten (siehe Review in Caspary et al., 1995).

3.2 Gradienten entlang der dorsoventralen Achse des IC

Die in dem detailliert untersuchten Bereich erhobenen Daten sollten außerdem dazu dienen, eventuelle Gradienten innerhalb der Messparameter entlang der dorsoventralen Achse des IC festzustellen, die einer tonotopen Gliederung (vom dorsalen niedrigfrequenten zum ventralen hochfrequenten Bereich) entspricht. So kann beantwortet werden, ob sich Eigenschaften (Querschnittsfläche, Grauwert) GABAerger Zellen entlang der dorsoventralen Achse ändern und im Alter unterschiedliche Veränderungen aufweisen. Damit soll untersucht werden, ob bestimmte Frequenzbereiche mehr oder weniger vom Alterungsprozess betroffen sind. Als Maßstab für den Grad der GABA-Expression werden wie bereits unter 3.1.4 beschrieben die Grauwerte und damit die Färbeintensität der Neurone herangezogen. Um die Unterschiede zwischen dorsal und ventral gelegenen Strukturen zu beschreiben, wird das sogenannte Y-Centroid verwendet, das den Abstand von der dorsalen Oberkante des IC im Auswertebereich in Millimetern angibt.

3.2.1 Zell-Querschnittsflächen

In der folgenden Grafik sind für die jungen (**Abb. 3.17**) und alten (**Abb. 3.18**) Tiere die Zell-Querschnittsflächen als Funktion des Y-Centroids (entspricht der Tiefe im IC) angegeben. Trotz der breiten Streuung ergibt sich aufgrund der hohen Anzahl der ausgewerteten Zellen in beiden Fällen eine leicht ansteigende lineare Regressionslinie (schwarze Linien). Die lineare Korrelationsanalyse zeigt sowohl bei den jungen ($r = 0,099$, $p = 0,035$) als auch bei den alten Tieren ($r = 0,069$, $p = 0,019$) eine signifikante Zunahme der Querschnittsfläche GABAerger Zellen von dorsal (tieffrequent) nach ventral (hochfrequent). Der Unterschied zwischen dorsal und ventral gelegenen GABAergen Zellen beträgt dabei 12-17 % und wird nur durch die große Stichprobe signifikant. Dies wird durch die R^2 Werte deutlich, die zeigen, dass die Veränderung des Y-Centroids nur jeweils weniger als 1 % (jung) bzw. 0,5 % (alt) der Variabilität der Querschnittsfläche erklären.

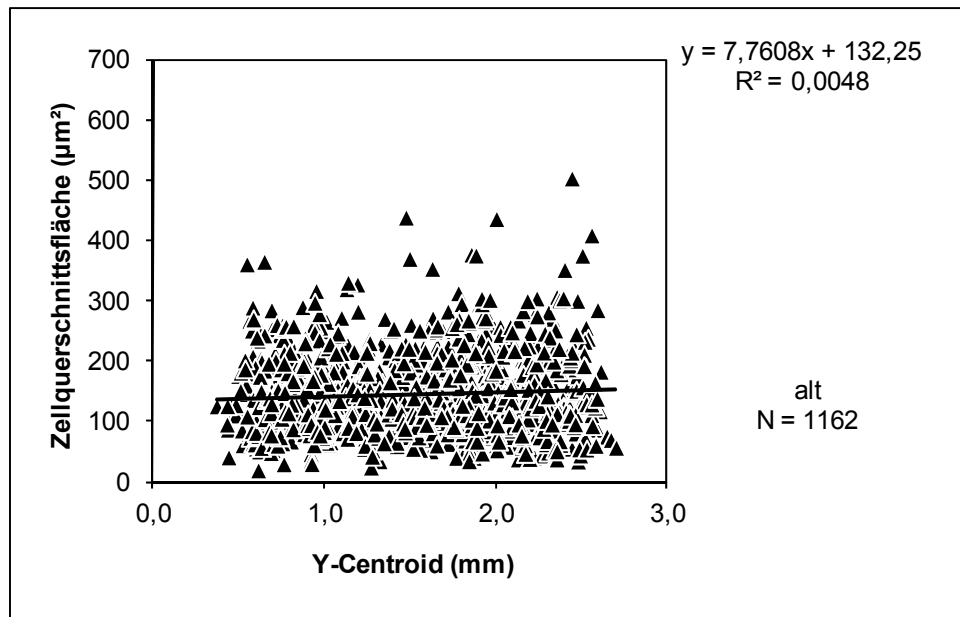


Abb. 3.17: Zellquerschnittsfläche (µm²) in Relation zum Y-Centroid (mm) bei jungen Tieren (N =7). Die Anzahl der vermessenen Zellen beträgt 455. Die lineare Regressionslinie ist schwarz dargestellt.

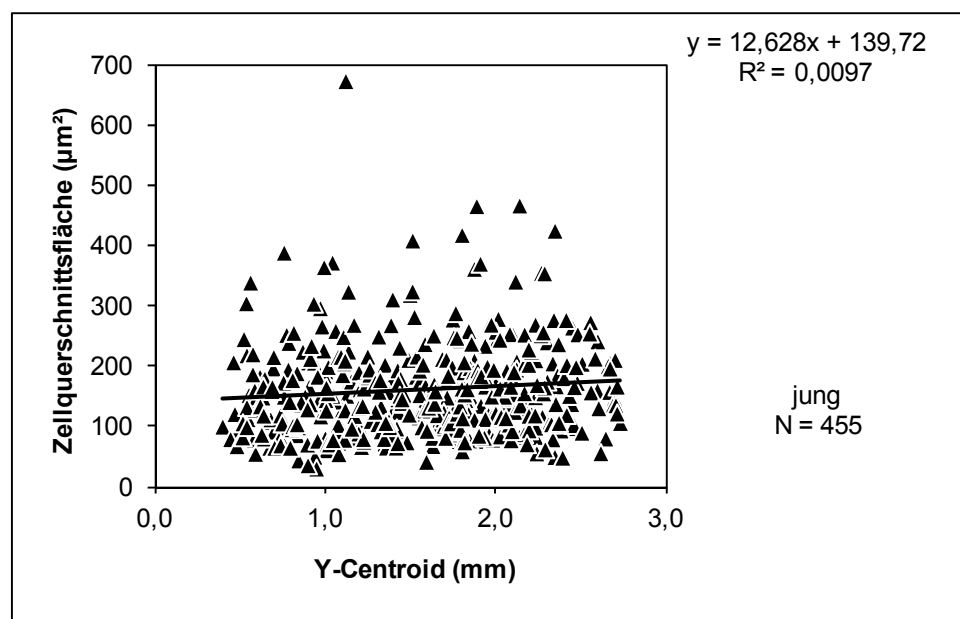


Abb. 3.18: Zellquerschnittsfläche (µm²) in Relation zum Y-Centroid (mm) bei alten Tieren (N = 18). Die Anzahl der vermessenen Zellen beträgt 1162. Die lineare Regressionslinie ist schwarz dargestellt.

Aus den Regressionslinien in Abb. 3.17 und 3.18 ergibt sich nahe der dorsalen Oberfläche des IC eine mittlere Zellgröße von 146 µm² bei jungen und 136 µm², also einem um 6,8 % geringeren Wert, bei alten Tieren. Bei einem Abstand von 2,5 mm von der IC Oberfläche betragen die entsprechenden Werte 171 µm² und 152 µm² bei jungen und alten Tieren, also eine Abnahme um 11,1 % bei alten Tieren.

Insgesamt weisen diese Befunde darauf hin, dass die Querschnittsfläche der GABAergen Neurone entlang der gesamten dorsoventralen Achse des IC bei alten Tieren im Mittel geringfügig unter der von jungen Tieren liegt und der Unterschied zwischen alten und jungen Tieren im ventralen, also hochfrequenten Bereich des IC geringfügig größer als im dorsalen tief-frequenten Bereich ist. Allerdings bleibt aufgrund der erheblichen Streubreite der Daten (wie anhand der großen Punktwolken in den beiden obigen Abbildungen erkenntlich ist) zunächst unklar, ob diese geringen Unterschiede wirklich relevant sind.

Dies wird auch deutlich, wenn man die linearen Regressionslinien aus Abbildung 3.17 und 3.18 mit den Gruppenmittelwerten von Centroid und Zellquerschnittsfläche der Neurone junger und alter Tiere für 0,5 mm große Segmente entlang der dorso-ventralen Achse des IC vergleicht (siehe **Abb. 3.19**).

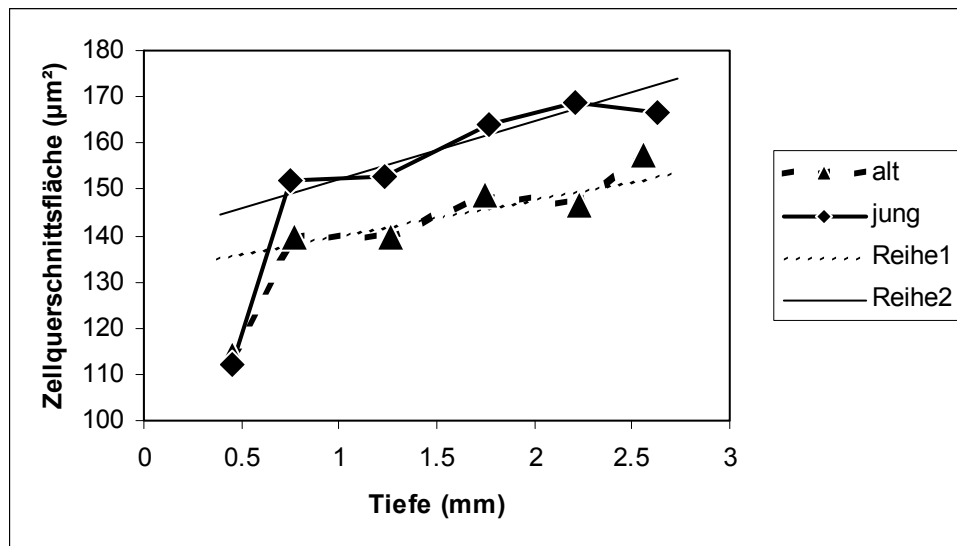


Abb. 3.19: Zellquerschnittsfläche (μm^2) in Relation zur Tiefe/Y-Centroid (mm) bei jungen und alten Tieren. Die gestrichelte Reihe 1 entspricht der linearen Regressionsgeraden der alten Tiere aus Abb. 3.18. Die durchgezogene Reihe 2 entspricht der linearen Regressionsgeraden der jungen Tiere aus Abb. 3.17. Die Gruppenmittelwerte für die jeweiligen Tiefenbereiche (in 0,5mm Schritten) alter Tiere werden durch die mit einer gestrichelten Linie durchzogenen Dreiecke dargestellt, die Mittelwerte der jungen Tiere zeigen die mit der durchgezogenen Linie verbundenen Rauten.

Der Sprung in der Größe von der Oberfläche des IC (0-0,5mm) zu den tieferen Bereichen könnte durch den Unterschied zwischen dem zentralen Kern des IC und peripheren Bereichen begründet werden. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen den dorsoventralen Positionen im IC und den Altersgruppen trotz der beschriebenen erheblichen Streuung signifikant sind, wurde eine Varianzanalyse der

Zellquerschnittsfläche (Mittelwert des entsprechenden dorsoventralen Segments bei jedem Tier) für die Faktoren „Tiefe“ innerhalb des IC (0-0,5 mm, 0,5-1 mm, 1-1,5 mm, 1,5-2 mm, 2-2,5 mm, 2,5-3 mm) und „Altersgruppe“ (jung und alt) mit dem Programm SigmaStat 2.03 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in der untersuchten Stichprobe ein Trend für einen Effekt des Alters ($p = 0,08$) mit geringfügig reduzierter Querschnittsfläche bei alten Tieren bestand. Der für das Signifikanzniveau kritische p -Wert von $< 0,05$ wurde dabei allerdings nicht erreicht. Die Tiefe, also der Abstand von der dorsalen Oberfläche des IC, hatte bei dieser Analyse keinen signifikanten Einfluss auf die Zell-Querschnittsfläche ($p = 0,164$) und es bestand auch keine signifikante Interaktion zwischen der Altersgruppe der Tiere und der Tiefe ($p = 0,955$).

Die Hypothese, dass die Querschnittsfläche GABAerger Neurone im ventralen hochfrequenten Bereich des IC bei alten Tieren stärker (im Sinne einer geringeren Querschnittsfläche) beeinträchtigt sein könnte als im dorsalen tieffrequenten Bereich, konnte also statistisch nicht belegt werden.

3.2.2 Grauwerte GABAerger Zellen

Bei den Grauwerten GABAerger Zellen wird trotz erheblicher Variabilität ein dorso-ventraler Gradient etwas klarer. Die positive Steigung der schwarzen Regressionsgeraden in **Abb. 3.20** und **Abb. 3.21** zeigt den gleichsinnigen Zusammenhang zwischen größer werdendem Y-Centroid, also dem Abstand von der dorsalen Oberfläche des IC, und steigendem Grauwert. Hier ergeben sich bei der linearen Korrelation sowohl für die jungen Tiere ($r = 0,164$, $p < 0,001$) als auch für die alte Tiere ($r = 0,271$, $p < 0,001$) hoch signifikante Zusammenhänge. Dorsal gelegene Zellen weisen im Mittel geringere Grauwerte auf (sie sind also dunkler gefärbt) als ventral gelegene Zellen. Wenn man aufgrund der Korrelationslinien die Werte bei 0,5 mm (dorsal) und 2,5 mm (ventral) berechnet, zeigen sich dorsal bei jungen und alten Tieren im Mittel identische Grauwerte (bei beiden Gruppen beträgt der Wert 89), während ventral die Werte bei alten Tieren (130) deutlich über denen der jungen Tiere (114) liegen.

Die linearen Regressionsgeraden deuten also darauf hin, dass die Grauwerte im ventralen, hochfrequenten Bereich des IC bei alten Tieren höher, und damit die Färbeintensität und die Expression von GABA geringer als bei jungen Tieren sind.

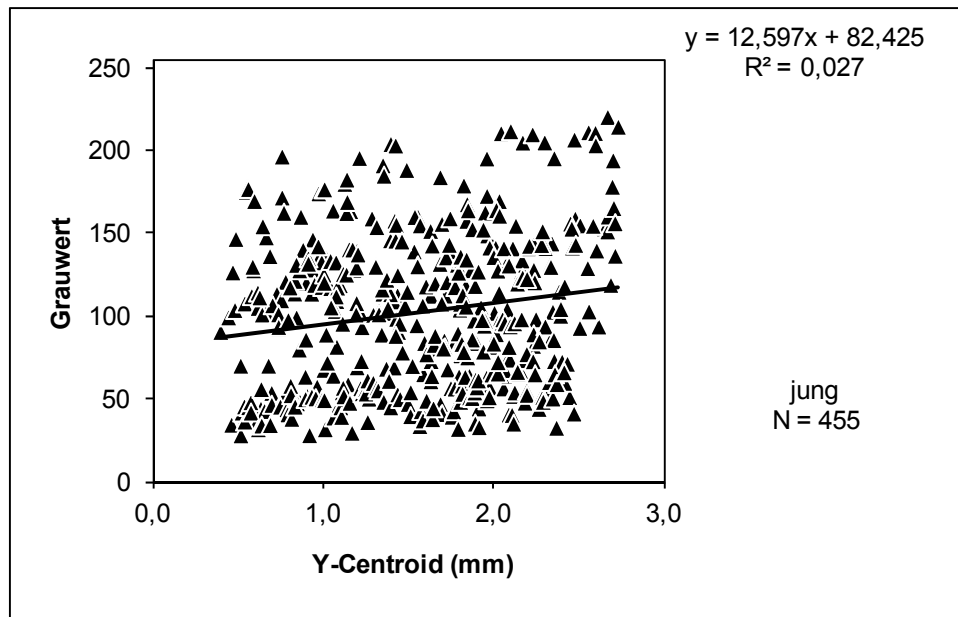


Abb. 3.20: Grauwerte GABAerger Neurone als Funktion des Y-Centroids (mm) im IC junger Tiere (N = 7). Die Anzahl vermessener Zellen beträgt 455. Die schwarze Linie stellt die Regressionsgerade dar.

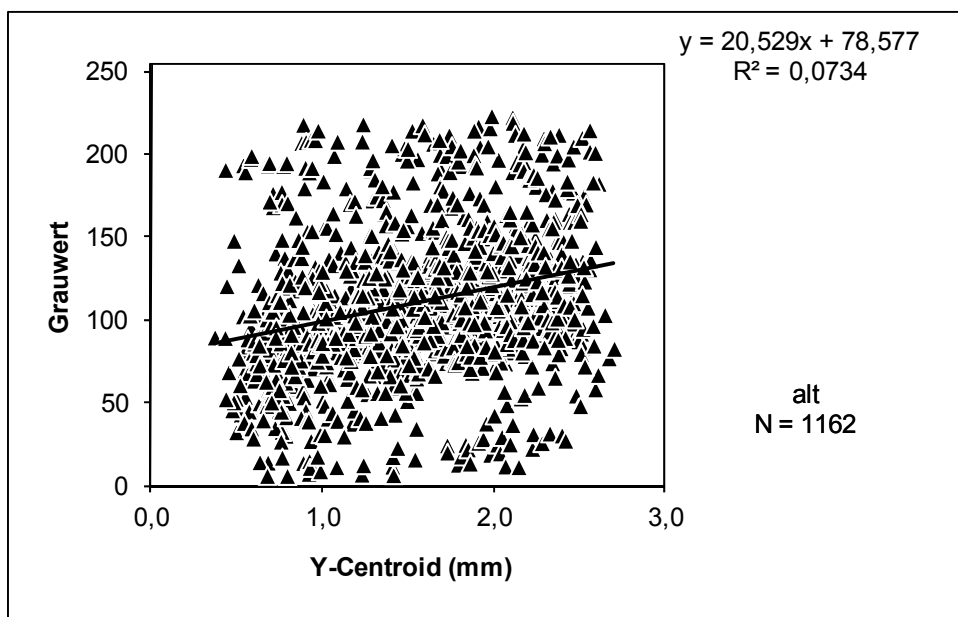


Abb. 3.21: Grauwerte GABAerger Neurone als Funktion des Y-Centroids (mm) im IC alter Tiere (N = 18). Die Anzahl vermessener Zellen beträgt 1162. Die Regressionslinie ist schwarz dargestellt.

Angesichts der enormen Streuung der Daten muss dieses Ergebnis aber ebenfalls kritisch interpretiert werden. Dies zeigt auch der Vergleich der linearen Regressionslinien mit den Gruppenmittelwerten für 0,5 mm Segmente von dorsal nach ventral entlang des IC in **Abb. 3.22**: Bei den alten Tieren sind sich die Gruppenmittelwerte und die lineare Regression in der Darstellung des Verlaufs der Änderung des Grauwerts entlang der dorso-ventralen Achse sehr ähnlich. Dagegen bestehen bei den jungen Tieren in einigen Segmenten erhebliche Unterschiede. Trotzdem deutet auch hier der Vergleich der Gruppenmittelwerte der beiden Altersklassen darauf hin, dass im Bereich von 1,5 bis 2,5 mm von der dorsalen Oberfläche des IC entfernt die Grauwerte der Neurone bei alten Tieren höher und damit die GABA-Expression im Vergleich zu jungen Tieren reduziert ist.

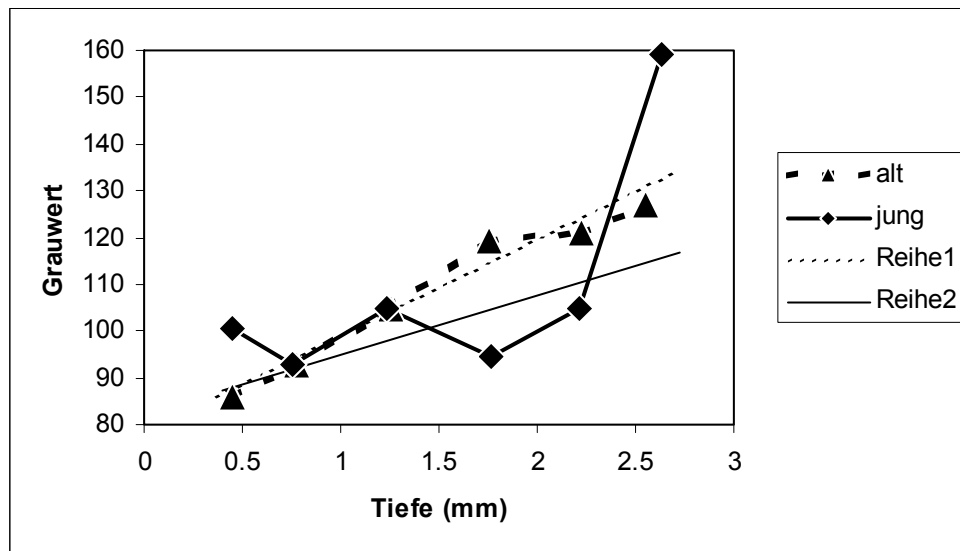


Abb. 3.22: Grauwert GABAerger Neurone in Relation zu deren Lage (Tiefe in mm) im IC.

Die gestrichelte Linie (Reihe 1) entspricht der linearen Regressionsgeraden der alten Tiere aus Abb. 3.21. Die durchgezogene Linie (Reihe 2) entspricht der linearen Regressionsgeraden der jungen Tiere aus Abb. 3.20. Die mit einer durchgehenden Linie verbundenen Rauten zeigen die Gruppenmittelwerte von Tiefe und Grauwert junger Tiere für 0,5 mm Segmente entlang der dorsoventralen Achse des IC. Die mit einer gestrichelten Linie verbundenen Dreiecke zeigen die entsprechenden Daten alter Tiere.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen den dorsoventralen Positionen und den Altersgruppen trotz der erheblichen Streuung signifikant sind, wurde wie für die Zell-Querschnittsflächen (in Abschnitt 3.2.1) eine Varianzanalyse der Grauwerte (Mittelwerte der Zellen des entsprechenden dorso-ventralen Segments bei jedem Tier) für die Faktoren „Tiefe“ und „Altersgruppe“ durchgeführt. Hier ergab sich keinerlei

Hinweis für einen signifikanten Einfluss der Altersgruppe ($p = 0,464$) oder der Tiefe ($p = 0,126$) auf die Grauwerte und es bestand auch keine signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren selbst ($p = 0,915$). Die Hypothese, dass die Expression von GABA im ventralen hochfrequenten Bereich des IC bei alten Tieren stärker abnehmen könnte als im dorsalen niedrigfrequenten Bereich konnte also statistisch nicht belegt werden.

Zusammenfassend hat die Analyse der dorsoventralen Gradienten Hinweise dafür erbracht, dass die Zellquerschnittsfläche GABAerger Neurone von dorsal (tieffrequent) nach ventral (hochfrequent) sowohl bei alten als auch bei jungen Tieren geringfügig zunimmt (Abb. 3.16-3.19), während eine leichte Zunahme der Grauwerte auf eine geringere Expression von GABA in den ventral gelegenen (hochfrequenten) Neuronen des IC hinweist (Abb. 3.20-3.21).

Der Vergleich der Ergebnisse von jungen und alten Tieren weist darauf hin, dass Unterschiede der Querschnittsfläche der Neurone und der Expression von GABA im ventralen also hochfrequenten Bereich des IC tendenziell größer sind (siehe Vergleich der Regressionslinien in Abb. 3.19 und 3.22). Allerdings zeigten Varianzanalysen für die Querschnittsfläche und den Grauwert GABAerger Zellen, dass diese Unterschiede zwischen den Altersgruppen und der Tiefe im IC in der vorliegenden Stichprobe nicht signifikant waren und auch keine signifikante Interaktion zwischen diesen beiden Faktoren bestand. Der Einfluss des Alters entlang der dorso-ventralen (tonotopen) Achse des IC von Wüstenrennmäusen ist, wenn überhaupt vorhanden, sehr gering.

3.3 Auswirkung von Schädigungen des Mittelohrs und des Gehörgangs auf die lokale Dichte GABAerger Zellen im IC

Bislang wurden in den grafischen Darstellungen und den statistischen Auswertungen die Tiere mit ipsi-, contra- und bilateraler Hörstörung ausgeklammert. Da pathologische Veränderungen im Mittelohr oder im Gehörgang erst bei der Präparation nach der Perfusion der Tiere festgestellt werden konnten, ist unklar wie lange eine dadurch hervorgerufene Hörstörung bestand, ob sie ausschließlich auf einer gestörten Schalleitung beruhte, oder ob eine Entzündung im Mittelohr auch die Funktion des Innenohres beeinträchtigte. Bei 2 Tieren wurde der IC contralateral zum betroffenen Ohr und bei 6 Tieren der IC ipsilateral zum betroffenen Ohr ausgewertet. Diese 8 Tiere waren zwischen 32 und 53 Monate alt. Bei einem 15 Monate alten Tier lag eine bilaterale Hörstörung vor. Aufgrund dieser kleinen Stichproben war eine sinnvolle

statistische Analyse der Ergebnisse dieser Tiere nicht möglich. Während der initialen Auswertung und grafischen Darstellung der Daten wurden auch diese Tiere mit einbezogen, aber ihre Daten lagen meist innerhalb des Bereichs in dem auch die Ergebnisse der Tiere ohne Hörstörung streuten.

Um zumindest qualitativ von dem möglichen Einfluss der unterschiedlichen Hörstörungen zu berichten, werden für die wichtigsten Parameter die Gruppenmittelwerte in einer Tabelle aufgelistet und als Balkendiagramme dargestellt. Die Reihenfolge ist hierbei dieselbe wie bei der Darstellung der Ergebnisse gesunder Tiere: Zunächst wird auf die Querschnittsfläche des IC, die Anzahl und Dichte GABAerger Neurone eingegangen, darauf folgt eine kurze Darstellung der Zell-Querschnittsflächen und der Grauwerte von GABA exprimierenden Neuronen und dem Neuropil. Dabei muss stets beachtet werden, dass nur bei einem Tier ein IC mit bilateraler und bei 2 Tieren ein IC mit contra-lateraler Hörstörung untersucht wurde.

In dem Balkendiagramm in **Abb. 3.23** wird deutlich, dass die IC-Querschnittsfläche von Tieren mit einer Hörstörung kaum von dem Mittelwert der Querschnittsfläche alter Tiere abweicht.

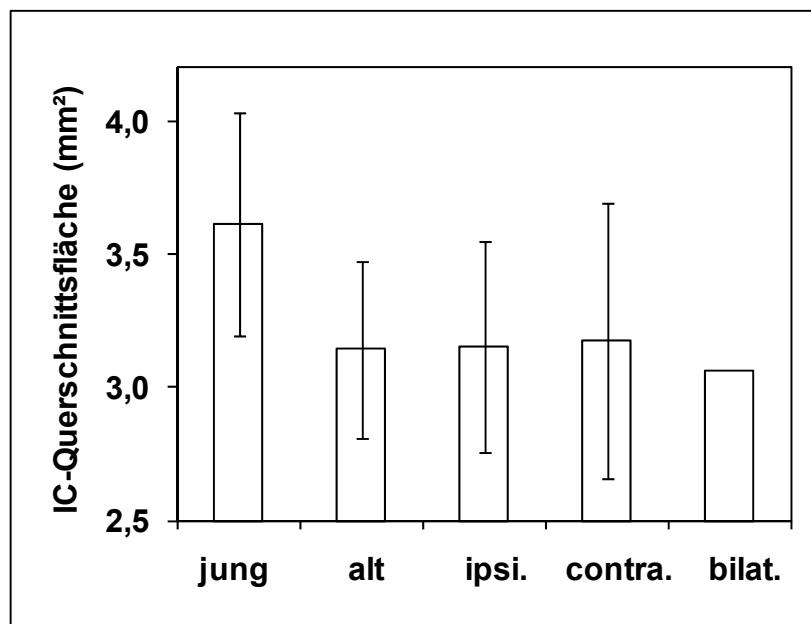


Abb. 3.23: Vergleich der ermittelten IC-Querschnittsflächen (mm²) von gesunden Tieren (jung: mittleres Alter = 4,5 Monate; alt: mittleres Alter = 43,3 Monate) und Tieren mit einer Hörstörung. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

Wie aus der **Tabelle 3.1** hervorgeht, erreichten die 6 Tiere mit einer Hörstörung im ipsilateralen IC im Durchschnitt ein Alter von 43,6 Monaten. Die 2 Tiere mit einer contralateralen Hörstörung hatten im Mittel ein ähnliches Alter von 38,6 Jahren. Die Tiere mit ipsi- oder contralateraler Hörstörung haben also altersadäquate IC-Querschnittsflächen. Ein offensichtlicher Einfluss der Hörstörung konnte somit nicht nachgewiesen werden. Die IC-Querschnittsfläche des 14,8 monatigem Tiers mit beidseitiger Hörstörung fällt etwas kleiner als erwartet aus, da es sich altersgemäß im Diagramm eher dem Balken junger Tiere nähern müsste.

Gruppe	normal jung	normal alt	Hörstörung ipsilateral	Hörstörung contralateral	Hörstörung bilateral
Anzahl	N=7	N=18	N=6	N=2	N=1
Alter (Monate)	4,5 (+/-3,04)	43,3 (+/-7,03)	43,6 (+/-8,06)	38,6 (+/-1,90)	14,8
Anzahl GABAerger Neurone	144,6 (+/-28,23)	166,2 (+/-47,99)	184,2 (+/-58,71)	103,5 (+/-13,44)	94,0
Breite des IC (mm)	2,10 (+/-0,14)	2,00 (+/-0,11)	1,92 (+/-0,15)	1,95 (+/-0,07)	1,90
Höhe des IC (mm)	2,40 (+/-0,21)	2,25 (+/-0,17)	2,23 (+/-0,20)	2,30 (+/-0,28)	2,30
IC-Querschnittsfläche (mm ²)	3,62 (+/-0,42)	3,14 (+/-0,33)	3,15 (+/-0,40)	3,18 (+/-0,52)	3,06
Zelldichte	40,7 (+/-10,88)	53,0 (+/-14,38)	59,2 (+/-20,03)	33,4 (+/-9,66)	30,7
Zellquerschnittsfläche (µm ²)	153,2 (+/-30,14)	143,9 (+/-12,30)	162,3 (+/-17,68)	155,7 (+/-23,56)	146,7
Grauwert Neurone	110,7 (+/-46,06)	109,7 (+/-39,93)	113,6 (+/-29,15)	148,0 (+/-71,66)	140,7
Grauwert Neuropil	182,6 (+/-41,26)	178,3 (+/-31,43)	179,9 (+/-27,28)	197,5 (+/-51,79)	209,5
Flächenanteil mit einer Dichte über 40,7 (%)	37,5 (+/-12,49)	52,8 (+/-17,95)	52,1 (+/-20,16)	27,0 (+/-11,82)	25,4
Flächenanteil mit einer Dichte über 40,7 (mm ²)	1,32 (+/-0,34)	1,66 (+/-0,62)	1,64 (+/-0,67)	0,83 (+/-0,24)	0,78

Tabelle 3.1: Gruppenmittelwerte der analysierten Parameter von Tieren mit und ohne („normal jung“; „normal alt“) Hörstörung und bilateraler (N =1) Hörstörung im Vergleich zu normal hörenden. Die Standardabweichungen sind jeweils in Klammern angegeben.

Wie das Diagramm in **Abb. 3.24** zeigt, scheint die Anzahl GABAerger Neurone bei ipsi-lateraler Hörstörung gegenüber jungen und alten Tieren ohne Hörstörung erhöht zu sein. Die Daten bei contra-lateraler und bilateraler Hörstörung weisen dagegen eher auf eine Abnahme der Anzahl GABA-exprimierender Zellen hin.

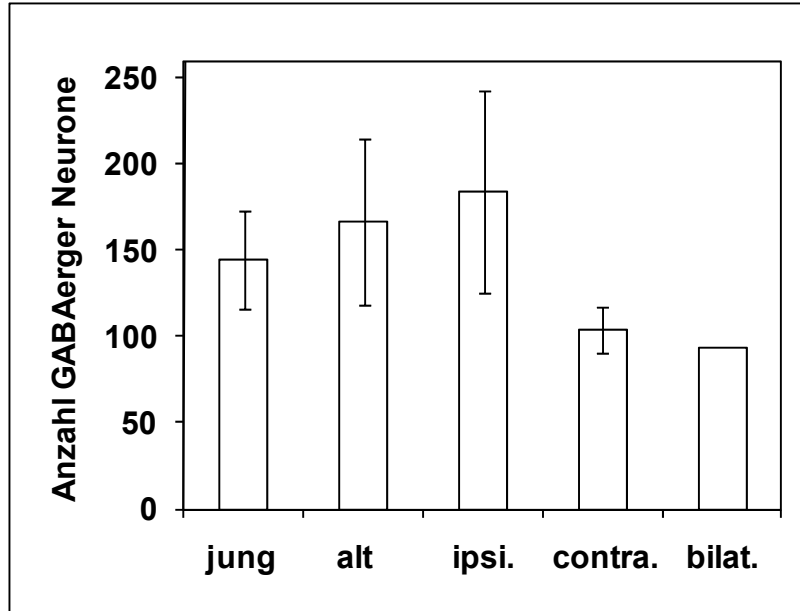


Abb. 3.24: Darstellung der Anzahl GABAerger Neurone bei alten und jungen gesunden Tieren und Tieren mit Hörstörungen ipsi-, contra- oder bilateral des untersuchten IC. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

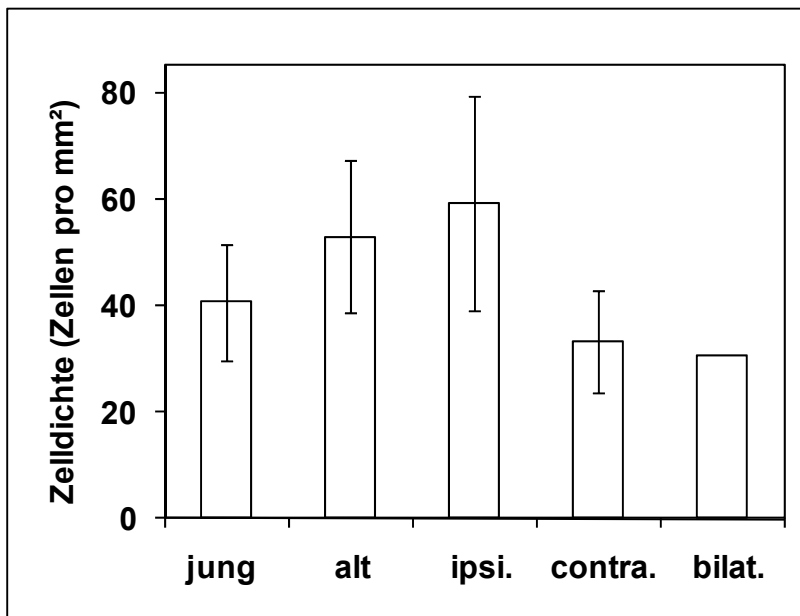


Abb. 3.25: Darstellung der Dichte GABAerger Neurone (Zellen pro mm²) im IC gesunder (junger und alter) und hörgeschädigter Tiere. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

Als Konsequenz aus den Daten der IC-Querschnittsfläche und der Anzahl der Neurone ergibt sich eine erhöhte Dichte GABAerger Neurone bei Tieren mit einer Hörstörung ipsilateral des untersuchten IC und eine verminderte Dichte bei contralateraler oder bilateraler Hörstörung (**Abb. 3.25**).

Auch wenn man den Anteil des IC mit einer Zelldichte über 40,7 Zellen/mm² betrachtet (**Abb. 3.26**), haben alte Tiere und solche mit ipsilateraler Hörstörung höhere Werte als junge Tiere, während die mit contralateraler und bilateraler Hörstörung eher niedrigere Werte aufweisen.

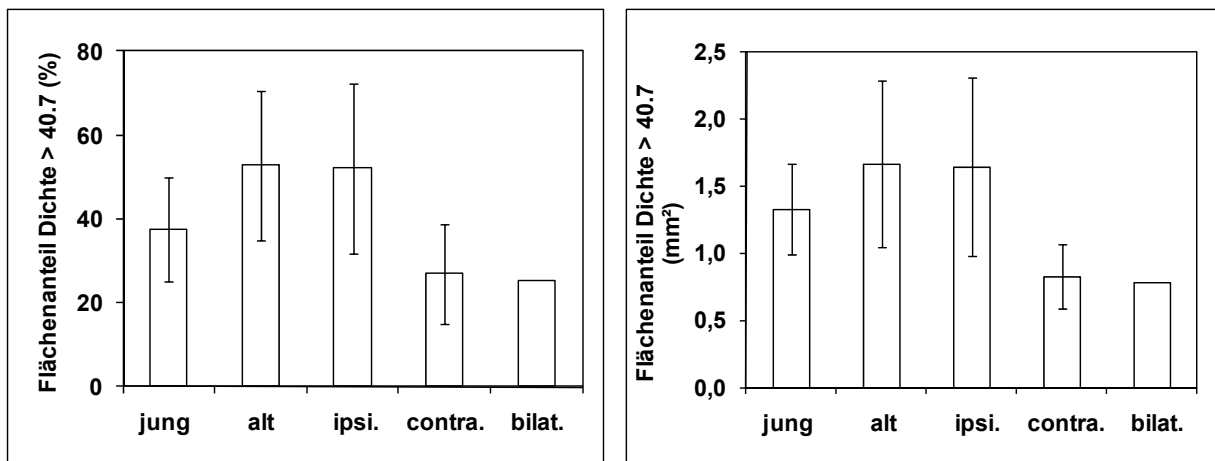


Abb. 3.26: Flächenanteil des IC mit einer Dichte (Zellen/mm²) GABAerger Neurone > 40,7 in Prozent (linke Seite) und in mm²(rechte Seite) von gesunden und hörgeschädigten Tieren. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

Wie unter Punkt 3.1.3 aufgeführt ist, variiert die Verteilung GABAerger Neurone bei gesunden Tieren systematisch innerhalb des IC. Dieses Muster (ein Band mit einer hohen Dichte GABAerger Neurone zieht bei jungen und alten Tieren in der lateralen Hälfte des IC von dorsal nach ventral) lässt sich insgesamt auch bei den 9 hörgeschädigten Tieren zeigen (**Abb. 3.27**).

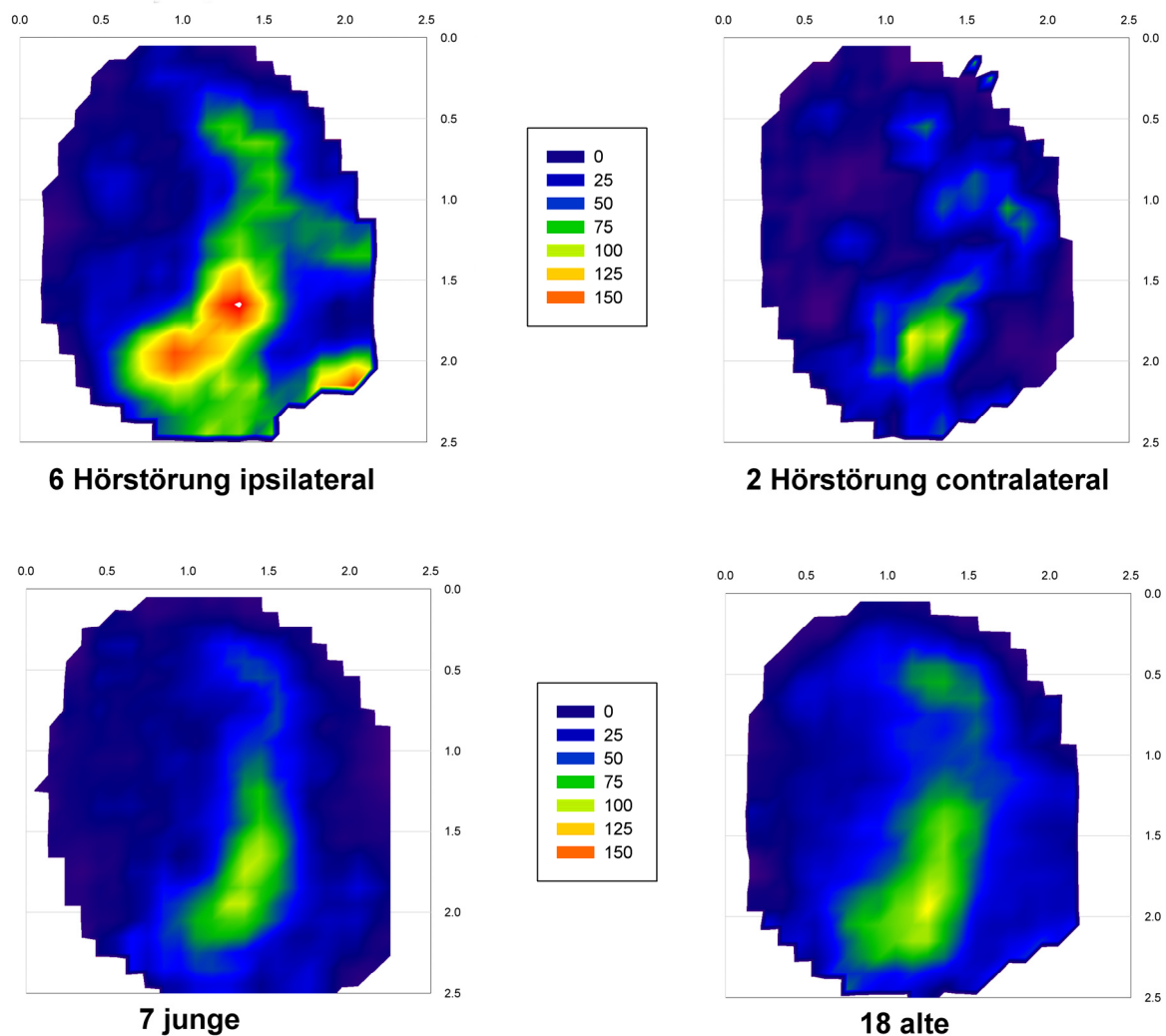


Abb. 3.27: Lokale Dichte GABAerger Neurone (pro mm²) im IC bei Tieren mit ipsi- (N = 6), contra- (N = 2), und bilateraler (N = 1) Hörstörung im Vergleich zu normal hörenden jungen Tieren (N = 7). Über den Abbildungen ist jeweils die Distanz von der medialen; rechts der Abbildungen die Distanz von der dorsalen Begrenzung des IC in Millimetern angegeben. Die Farbcodierung ist in der Legende zwischen den beiden Abbildungen dargestellt und wird in Schritten von 25 Zellen/mm² abgestuft.

In diesen Karten kann man aber auch deutlich die im Vergleich zu gesunden Tieren höhere Dichte GABAerger Neurone bei den Tieren mit einer Hörstörung auf der ipsilateralen Seite des untersuchten IC sehen (grün bis rote Farbcodierung).

Bei den Tieren mit einer contralateralen Hörstörung zeigt sich kongruent mit den oben dargestellten Diagrammen eine verminderte Dichte GABAerger Neurone im Vergleich zu den darunter dargestellten Karten gesunder Tiere.

Wie das Balkendiagramm in **Abb. 3.28** zeigt, finden sich bei der Zell-Querschnittsfläche die höchsten Werte bei den Tieren mit ipsilateraler Hörstörung. Dann folgen die jungen Tiere und die mit contralateraler Hörstörung. Die niedrigsten Werte findet man bei alten Tieren und dem Tier mit einer bilateralen Hörstörung.

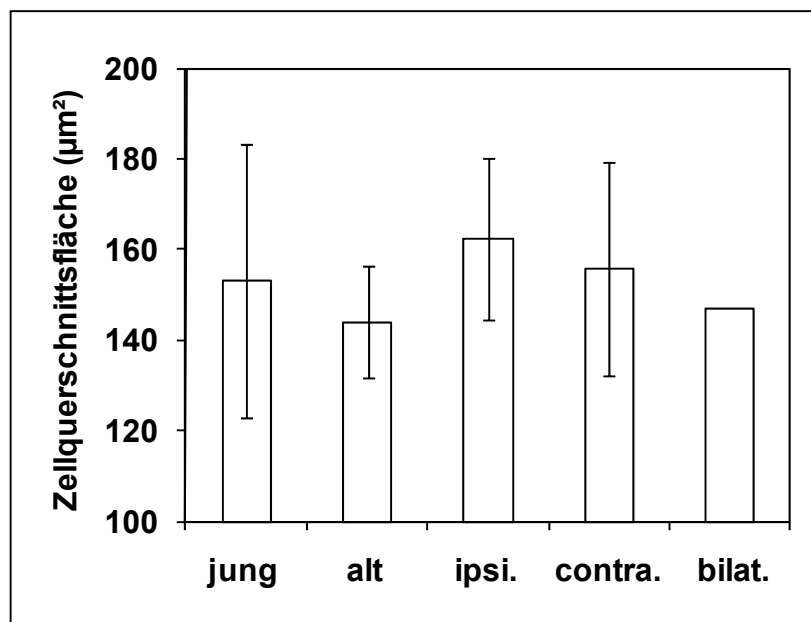


Abb. 3.28: Vergleich der mittleren Querschnittsfläche (μm²) GABAerger Neurone im IC gesunder und hörgeschädigter Tiere. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

Der Vergleich der Grauwerte von GABA-exprimierenden Neuronen und des Neuropils in **Abb. 3.29** zeigt sehr ähnliche Mittelwerte für gesunde Tiere und solche mit einer ipsilateralen Hörstörung. Bei den beiden Tieren mit contralateraler und dem Tier mit bilateralen Hörstörung scheinen die Grauwerte etwas erhöht, was auf eine verminderte Expression von GABA hindeutet.

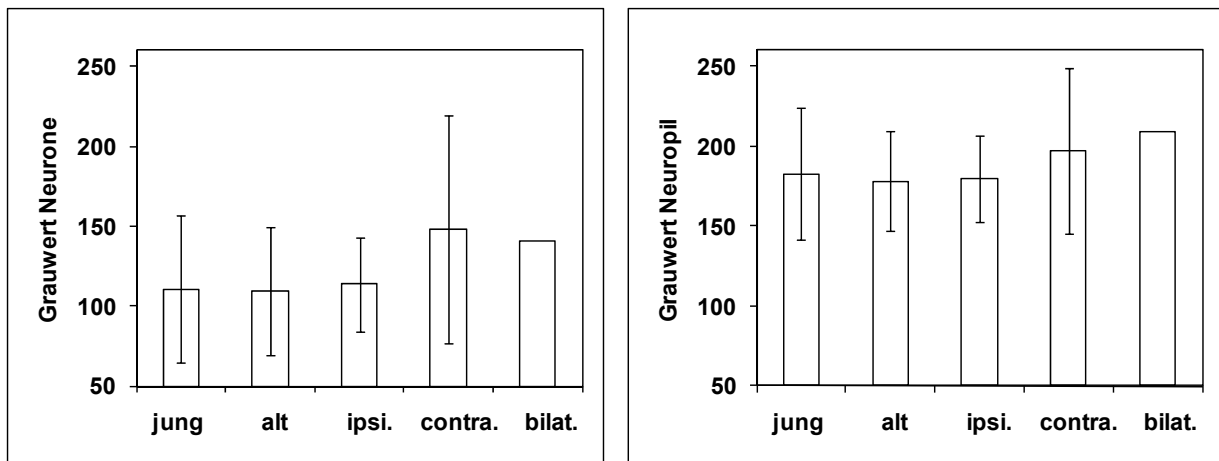


Abb. 3.29: Vergleich der Grauwerte von GABAergen Neuronen und des Neuropils von jungen und alten Tieren mit solchen mit ipsi-, contra- und bilateraler Hörstörung. Die Standardabweichungen werden durch die schwarzen Fehlerbalken dargestellt.

Zusammenfassend scheint eine ipsilaterale Hörstörung zu einer Zunahme der Anzahl und Querschnittsfläche sowie der Dichte GABAerger Neurone im IC zu führen (Abb. 3.24, 3.25 und 3.28). Eine contralateral zum untersuchten IC gelegene Hörstörung scheint dagegen eher mit einer Abnahme der Anzahl GABAerger Neurone und damit deren Dichte sowie einer geringeren Expression von GABA (erhöhte Grauwerte) einherzugehen (Abb. 3.24, 3.25 und 3.29), obwohl diese Ergebnisse aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht statistisch abgesichert werden können und deshalb nicht überinterpretiert werden sollten.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Colliculus inferior von Wüstenrennmäusen anhand immunhistologischer Gehirnschnitte auf altersbedingte Veränderungen hin zu untersuchen. Dabei konnten Hinweise auf eine Veränderung der Größe des IC gefunden werden, eine altersbedingte Abnahme von Indikatoren für die Funktion des GABAergen Systems wurde im Gegensatz zu der in bisheriger Literatur vertretenen Hypothese nicht bestätigt. Altersspezifische Veränderungen der Größe und Expression GABAerger Zellen innerhalb der tonotop gegliederten dorsoventralen Achse des IC konnten statistisch nicht belegt werden. Des Weiteren wurden mögliche Einflüsse peripherer ipsi- und contralateraler Hörstörungen auf GABAerge Neurone im IC dargestellt.

4.1 In bisherigen Arbeiten beschriebene Effekte des Alterns auf die Hörbahn

Neuronale Degeneration entlang der zentralen Hörbahn, den IC mit eingeschlossen, wurde sowohl bei Menschen als auch bei Primaten nachgewiesen (Kirikae et al., 1964; Hansen und Reske-Nielson, 1965). Histologisch kann es sich dabei um einen Verlust von Neuronen und Neuropil, ein Schrumpfen von Neuronen und Veränderungen in immunhistochemisch charakterisierten Strukturen handeln. Die genaueren Ursachen dieser Degeneration in Hinsicht auf den Status der Neurotransmitter wurden bei diesen älteren Studien noch nicht ermittelt.

Der aktuelle Stand der Literatur geht hierbei von Veränderungen der inhibitorischen Transmitter GABA und Glycin in den einzelnen Stationen der aufsteigenden Hörbahn aus. So konnte in verschiedenen Studien im Nucleus cochlearis (CN) und in den Kerngebieten der oberen Olive (Nuclei olivares superiores) und des Trapezkörpers (Corpus trapezoideum) eine Abnahme der Glyzingerne bzw. GABAergen Funktion nachgewiesen werden (vergl. Review in Caspary et al., 2008).

Die umfangreichsten Studien zu altersabhängigen Veränderungen des Colliculus inferior stammen von der Forschungsgruppe um D.M. Caspary, welche die Hypothese unterstützen, dass altersbedingte Veränderungen im GABA-Stoffwechsel des IC auftreten und nahelegen, dass es durch diese Veränderungen zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition kommt. Die Studien wurden an Fischer-344-Ratten durchgeführt und zeigten neben einer reduzierten Anzahl GABA-

immunreaktiver Neurone (um 36 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren) auch eine Abnahme der GABA-Konzentrationen und eine verminderte basale und K^+ -abhängige Freisetzung von GABA. Ebenso wurde eine verminderte Aktivität (um ca. 30 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren) der zur Synthese von GABA notwendigen Glutamat-Decarboxylase nachgewiesen (Caspary et al., 1990, 1995). Diese Daten stehen im Einklang mit anderen Studien mit F-344-Ratten, so zum Beispiel von Banay- Schwartz et al. (1989), die einen Rückgang des GABA-Gehalts im IC alter Tiere um 22 % aufzeigten. Auch scheinen bei alten Ratten die Bindungsstellen an $GABA_A$ - und $GABA_B$ -Rezeptoren reduziert zu sein (Gutiérrez et al., 1994; Milbrandt et al., 1994). Keine signifikanten Unterschiede konnten dagegen beim Gewebe-Gehalt (tissue level) und der K^+ -abhängigen Freisetzung von Glutamat, Aspartat, Tyrosin und Acetylcholin gefunden werden (Caspary et al., 1990), was darauf hindeutet, dass andere Neurotransmittersysteme im IC keinem derartigen Alterungsprozess unterliegen.

4.2 Anzahl und Dichte GABAerger Neurone im IC von Wüstenrennmäusen und Ratten - Anlass für einen Vergleich peripheren Hörvermögens der beiden Versuchstiere im Alter

Wie im Vorausgehenden beschrieben, konnten Studien von Caspary et al. (1990, 1995) mit Ratten einen deutlichen Verlust der GABAergen Funktion im IC alter Tiere aufzeigen. Dabei handelte es sich um eine reduzierte Anzahl GABAerger Neurone, eine Abnahme der GABA-Konzentration sowie eine verminderte Freisetzung von GABA aus den Neuronen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen kein Hinweis auf einen Verlust GABAerger Neurone im IC alter Wüstenrennmäuse gefunden werden. Weder die Spearman Rangkorrelation ($N = 25$; $r = 0,391$; $p = 0,120$) noch der MWU-Gruppenvergleich ($p = 0,178$) ergaben eine signifikante Abnahme der Anzahl GABAerger Neurone. Durch eine signifikante (MWU-Gruppenvergleich: $p = 0,017$) altersbedingte Abnahme der IC-Querschnittsfläche um im Mittel 13,1 % ergab sich eine im Alter erhöhte Dichte GABAerger Neurone.

Die im detailliert untersuchten Bereich des IC ermittelten Ergebnisse zu den Grauwerten der GABAergen Neurone und des Neuropils, die keine Verminderung der Färbeintensität und damit keine Reduktion der GABAergen Expression im Alter zeigten, erscheinen kongruent zu den nicht vorhandenen altersbedingten Veränderungen der Anzahl

GABAerger Neurone und geben einen weiteren Hinweis darauf, dass der GABA-Stoffwechsel im Colliculus Inferior von Gerbils scheinbar wenig vom Alter beeinflusst wird.

Eine Studie von Helfert et al. (1999) zu altersbedingten Veränderungen des IC von Fischer-344-Ratten mit Hilfe von Immunogold-Elektronenmikroskopie konnte keinen Verlust von GABAergen Neuronen im Alter nachweisen, zeigte aber einen signifikanten Rückgang GABA-positiver Synapsen (um ca. 33 %), synaptischer Endungen (um ca. 30 %) und Dendriten bei 28 Monate alten Tieren im Vergleich zu solchen mit 3 Monaten. Deshalb legt Helfert nahe, dass die reduzierte Expression von GABA, wie sie in vorausgehenden Studien beschrieben wurde, vielmehr einem Verlust von GABAergen Synapsen und Dendriten als einem Verlust GABAerger Neuronen an sich zuzuschreiben ist. Eine von Helfert et. al in der genannten Studie beschriebene Zunahme der IC-Querschnittsfläche um 10,8 % bei älteren Tieren im Vergleich zur Gruppe mit 3 Monate alten Tieren stellt im Licht anderer Publikationen zu altersbedingten Veränderungen eine Ausnahme dar. Auch in der vorliegenden Studie konnte keine Zunahme, sondern die bereits oben erwähnte Abnahme der IC-Querschnittsfläche in der Gruppe der älteren Tiere ermittelt werden.

Eine weitere Arbeit mit von Casparys Publikationen abweichenden Ergebnissen stellt eine Studie zum Einfluss des Alters auf Calcium-Bindungsproteine im IC von F-344-Ratten dar, die mit Hilfe von Parvalbumin-Immunreaktivität durchgeführt wurde (Ouda et al., 2008). Da diese Proteine häufig in Verbindung mit GABA anzutreffen sind, galt es herauszufinden, ob es im Alter auch hier zu einer Reduzierung kommt. Die Anzahl Parvalbumin-positiver Neurone bei 22 Monate alten Ratten änderte sich dabei im Vergleich zu jungen Tieren nicht. Zwar sind der Transmitter GABA und das Calcium-Bindungsprotein trotz ihrer Koloalität sicherlich als zwei individuelle Parameter anzusehen, doch sind diese Ergebnisse gerade unter der Frage nach einem altersbedingten Verlust GABAerger Neurone im IC von Ratten richtungsweisend und zeigen mitunter, dass hierzu widersprüchliche Befunde publiziert wurden.

Wenn aufgrund der bisher publizierten Studien dennoch insgesamt davon auszugehen ist, dass die pathologischen Veränderungen der GABAergen Funktion in der aufsteigenden Hörbahn bei Ratten im Alter größer sind als bei Gerbils, stellt sich die Frage, welche Faktoren dafür verantwortlich sein könnten.

Es gibt eine Reihe von Studien, die zeigen, dass bei Fischer-344 Rattenstämmen im Alter neben den oben beschriebenen Veränderungen der zentralen Hörbahn auch ein erheblicher peripherer (cochleärer) Hörverlust auftritt. So berichten Keithly et al. (1992) in einer Arbeit mit verschiedenen Rattenstämmen (u.a. Fischer-344) von altersbedingten pathologischen Veränderungen des Innenohrs. Es wurde eine signifikante Degeneration der Cochlea im apikalen Bereich beschrieben. Dabei waren sowohl die Haarzellen als auch die Stria vascularis betroffen.

Eine aktuellere Studie zu Fischer-344-Ratten als Versuchstiere in der Hörforschung (Syka, 2010) zeigte deutliche funktionelle und strukturelle Unterschiede in der Cochlea junger und alter Tiere. Ein wesentliches Merkmal der Hörfunktion war dabei die schnelle Verschlechterung des Audiogramms mit dem Alter, mit Reizschwellen-Veränderungen bis zu 20 dB bei niedrigen Frequenzen und 40 dB bei hohen Frequenzen bei 18-20 Monate alten Tieren. Auch Bielefeld et al. (2008) zeigten bei der F-344/NHsd Ratte, einer Untergruppe der Fischer-Ratte, periphere Hörverluste ab 12 Monaten. Mit 24 Monaten zeigten die Tiere bei der Hirnstammaudiometrie bereits Hörverluste von 50-60 dB bei 20 und 40 kHz. Die in diesem Ausmaß frühzeitig eingeschränkte Hörfunktion scheint dabei spezifisch den Stamm der F-344-Ratten zu betreffen, wie ein Vergleich mit Long-Evans Ratten ergab, die selbst im Alter von 30 Monaten nur einen Hörverlust von 5-20 dB bei verschiedenen Frequenzen zeigten (Syka, 2010). Übereinstimmend mit den beschriebenen Befunden ist auch die Amplitude der Aktionspotentiale (CAP) des Hörnervs bei 24 Monate alten F-344-Ratten im Gegensatz zu 3 Monate alten Tieren vermindert (Bielefeld et al., 2008), was dafür spricht, dass der Eingang an Informationen in das zentrale auditorische System bei alten Tieren dieses Stamms geringer ist. Auch die Prüfung der Otoakustischen Emissionen (OAE), einem geläufigen Verfahren zur Überprüfung der Funktion des Innenohrs, zeigte einen kontinuierlichen Verlust der Amplituden im Laufe des Alters bis zum völligen Verschwinden im Hintergrundgeräusch bei 18 Monate alten F-344-Ratten (Syka, 2010; Bielefeld et al., 2008). Wie die schon genannten Befunde von Keithly et al. (1992) sprechen auch diese Ergebnisse für einen altersbedingten Funktionsverlust der äußeren Haarzellen bei Fischer-344-Ratten.

Zusammengefasst weisen diese Studien auf eine deutlich eingeschränkte Funktion des Innenohrs und damit des peripheren Hörens bei F-344-Ratten im Alter hin.

Im Gegensatz dazu scheint der periphere (cochleäre) Hörverlust bei Wüstenrennmäusen weniger stark ausgeprägt zu sein. Eine Studie zum Hörverlust domestizierter Gerbils im Alter führten Sinnott et al. (1997) durch. Dabei wurden Vokale mit überwiegend unter 1 kHz gelegenen Frequenzanteilen benutzt. Der ermittelte Hörverlust betrug bei 36 Monate alten Gerbils in diesem sehr tieffrequenten Bereich nur 20 dB, bei 2 kHz lag er bei nur 7 dB. Hamann et al. (2002) untersuchten das Hörvermögen junger und alter Wüstenrennmäuse mit elektrophysiologisch und verhaltensabhängig ermittelten Hörschwellen in höheren Frequenzbereichen. Die mit Hilfe der Tonaudiometrie erfassten Daten zeigten für Breitbandrauschen und 10kHz keinen signifikanten Hörverlust bis zu einem Alter von 3 Jahren. Erst bei sehr alten Gerbils (>36 Monate) nahm das Hörvermögen mit großer interindividueller Variabilität ab, wobei der Hörverlust bei einzelnen Tieren bis zu 40dB betrug, im Mittel aber deutlich niedriger (unter 20 dB) lag. Auch die Hirnstammaudiometrie war bei Tieren mit 18 Monaten unauffällig und zeigte erst ab einem Alter von 28-29 Monaten Hinweise auf einen altersbedingten Hörverlust mit einer über die Frequenzen fast einheitlichen Hörschwellenänderung von durchschnittlich 14 dB. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits vorhandenen Erkenntnissen, dass die mit Hirnstammaudiometrie ermittelten Reizschwellen im Schnitt etwas höher sind als die Ergebnisse der Verhaltenstests.

Insgesamt ist also davon auszugehen, dass der altersbedingte periphere Hörverlust bei Gerbils, anders als bei Ratten, nur in geringem Maße vorhanden ist. Er scheint dabei vor dem Alter von 36 Monaten lediglich auf tiefe Frequenzen beschränkt zu sein und fällt auch bei noch älteren Tieren meist mild aus.

Der aufgrund einer peripheren Hörstörung reduzierter Eingang an akustischen Informationen in die Hörbahn könnte nun ein wichtiger Faktor sein, der bei den Versuchstieren die Expression von GABA im IC beeinflusst. Es sollte deshalb erwogen werden, dass der ausgeprägte altersbedingte periphere Hörverlust bei Ratten möglicherweise einen wesentlichen Grund für die deutliche Reduktion der GABAergen Funktion im IC darstellt, wie sie u.a. von Caspary et al. (1990, 1995) beschrieben wurde. Andersherum scheint es naheliegend, dass es bei Gerbils, deren peripheres Hörvermögen im Alter kaum beeinflusst ist, nur zu einer geringeren Beeinträchtigung des GABA-Stoffwechsels im IC kommt. Die von vorherigen Studien abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu altersbedingten Veränderungen der Anzahl und

Dichte GABAerger Neurone im IC könnten somit durch die unterschiedliche Wahl des Versuchstiers (Ratte vs. Gerbil) begründet werden.

Auch Studien an anderen Kerngebieten der zentralen Hörbahn von Wüstenrennmäusen weisen auf eine nur geringe Beeinträchtigung inhibitorischer Transmitter im Alter hin. So konnte kein signifikanter Einfluss des Alters auf die Anzahl GABAerger und glyzinerger Neurone im AVCN (anteroventraler Kern des Nucleus cochlearis) und im DCN (dorsaler Cochleariskern) nachgewiesen werden und auch im dritten Unterkern des Nucleus Cochlearis, dem PVCN (posteroventraler Kern), zeigte sich keine Abnahme inhibitorischer Neurone im Alter (Stehle, 2010). In einer weiteren Arbeit zum lateralen Kern des Trapezkörpers (LNTB) und zur medialen superiore Olive (MSO) konnten keine Hinweise auf einen mit dem Alter assoziierten Verlust GABAerger und glyzinerger Neurone geliefert werden (Dalles, 2009). Ein Verlust von Zellen war beim Gerbil auch nicht für LSO (Gleich et al., 2004) und MNTB feststellbar (Gleich und Strutz, 2002), während dies für Ratten beschrieben ist.

Die Annahme, dass altersbedingte Veränderungen der Anzahl GABAerger Neurone, wie sie bei der Ratte beschrieben sind, möglicherweise primär durch einem peripheren Hörverlust bedingt sind, wird auch durch die bei der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten von Gerbils mit contralateraler und ipsilateraler Mittelohrentzündung gestützt. Die dadurch verursachte periphere Hörstörung (in Form einer verminderten Schallleitung bzw. einer eventuell beeinträchtigten Funktion des Innenohrs) und der folglich reduzierte akustische Eingang an Informationen in die aufsteigende Hörbahn führten auch beim Gerbil zu einer Reduktion der Expression von GABA im betreffenden IC.

Für zukünftige Studien, die zum Ziel haben rein zentrale altersbedingte Veränderungen des Hörsystems zu ermitteln, die nicht Folge eines peripheren Hörverlusts sind, erscheinen Gerbils somit besser geeignet als F-344-Ratten.

4.3 Altersbedingte Veränderungen der Querschnittsfläche des IC und anderer Kerngebiete der Hörbahn

Die bereits erwähnte statistisch signifikante Abnahme der Querschnittsfläche um im Mittel 13 % deutet auf eine mit dem Alter einhergehende Schrumpfung des Colliculus inferior bei Wüstenrennmäusen hin. Für einige andere Kerne der zentralen Hörbahn beim Gerbil konnte ebenfalls eine Abnahme der Querschnittsfläche gezeigt werden. Für

den AVCN, ein Kerngebiet des Nucleus cochlearis (CN), wurde im Mittel eine Abnahme von 12 % beschrieben (Stehle, 2010). Dalles (2009) berichtet von einer signifikanten Abnahme der MSO- (mediale superiore Olive) Querschnittsfläche im Alter von knapp 20 %, die Querschnittsfläche des LNTB (lateral Kern des Trapezkörpers) verringerte sich um knapp 6 %. Dagegen konnte weder in DCN und PVCN (Stehle 2010) im MNTB (medialer Teil des Trapezkörpers, Gleich und Strutz, 2002) noch in der LSO (laterale superiore Olive, Gleich et al., 2004) eine Abnahme der Querschnittsfläche beobachtet werden (**Abb. 4.1**).

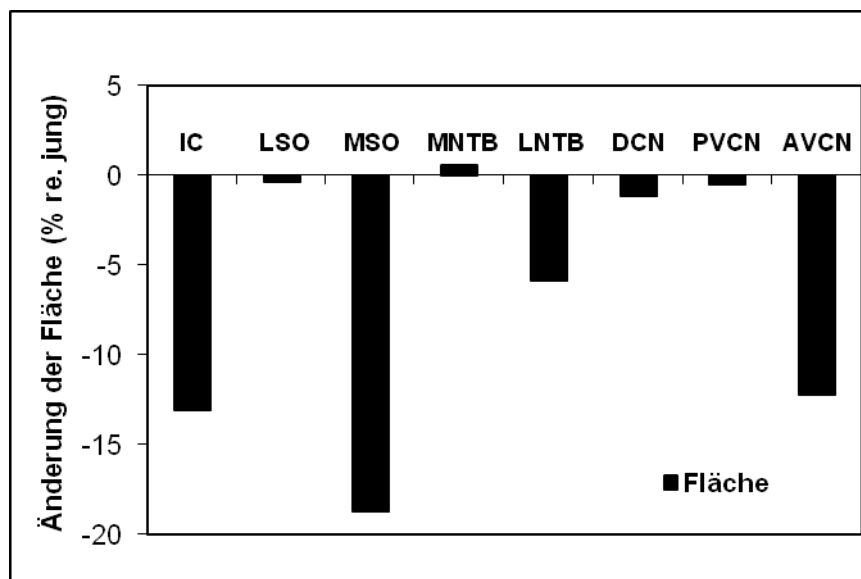


Abb. 4.1: Darstellung der prozentualen Veränderungen der Querschnittsflächen des IC und anderer Kerngebiete im Hirnstamm (schwarze Balken) bei alten (≥ 3 Jahre) Tieren im Vergleich zu jungen (< 1 Jahr) Tieren. Abbildung entnommen und modifiziert nach Gleich, O. (2007).

Insgesamt kann also nur bei einzelnen Kerngebieten der Hörbahn eine altersbedingte Veränderung der Querschnittsfläche beobachtet werden, eine einheitliche Größenabnahme aller untersuchten Gebiete konnte nicht nachgewiesen werden. Somit scheint es sich dabei nicht um eine globale Schrumpfung des Gehirns zu handeln, sondern um sehr spezifische Veränderungen in den einzelnen auditorischen Kernen.

Als mögliche Ursache der Größenabnahme der entsprechenden Kerngebiete könnte einerseits der Verlust von Neuronen oder deren Schrumpfung (abnehmende Querschnittsfläche), andererseits eine Reduktion des Neuropils, also des der Innervationsdichte entsprechenden, zwischen den Zellkörpern gelegenen Geflechts, in Frage kommen. Bei der vorliegenden Studie wurde kein Verlust GABAerger Neurone bei

alten Tieren gefunden. Zur verringerten Querschnittsfläche des IC im Alter könnte möglicherweise die Abnahme der Zellgrößen beitragen (vgl. Abb. 3.12). Hierbei war die mittlere Querschnittsfläche der GABAergen Neurone bei Tieren im Alter um 6,1 % im Vergleich zu jüngeren Tieren reduziert. Da es sich dabei aber um sehr geringe, weder in der Spearman Rangkorrelation noch im MWU-Gruppenvergleich signifikante Altersveränderungen handelt, ist der Einfluss auf die IC-Querschnittsfläche als gering einzuschätzen. Weder zur Anzahl, noch zur Größe von anderen Neuronen des IC, die kein GABA exprimieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Daten erhoben. Somit kann nicht geklärt werden, inwieweit möglicherweise ein Verlust oder eine Schrumpfung nicht-GABAerger Zellen oder auch eine Abnahme des Neuropils zur Abnahme der IC-Querschnittsfläche bei alten Tieren beitragen.

4.4 Die Verteilung GABAerger Neurone im IC und dessen tonotope Gliederung

Die Verteilung GABAerger Neurone innerhalb des IC-Querschnitts (im Ergebnisteil durch farbige Karten veranschaulicht, siehe Abb. 3.7), zeigte ein charakteristisches Muster, welches in ähnlicher Form auch in einer Arbeit von Cant und Benson (2005) beschrieben wird (**Abb. 4.2**). Dort wurden mit Hilfe histochemischer Färbemethoden zur Darstellung der Cytochromoxidase-Aktivität in den Neuronen dreidimensionale Karten des IC von Wüstenrennmäusen hergestellt, welche im Teil „Material und Methoden“ zur Auswahl der zu untersuchenden Gehirnschnitte in der vorliegenden Arbeit einbezogen wurden. Die Region der höchsten Cytochromoxidase-Aktivität von dorsal nach ventral ist vergleichbar mit der charakteristischen Verteilung GABAerger Zellen im IC junger und alter Tiere, bei der sich die höchste Dichte in der lateralen Hälfte des IC von dorsal nach ventral abzeichnet.

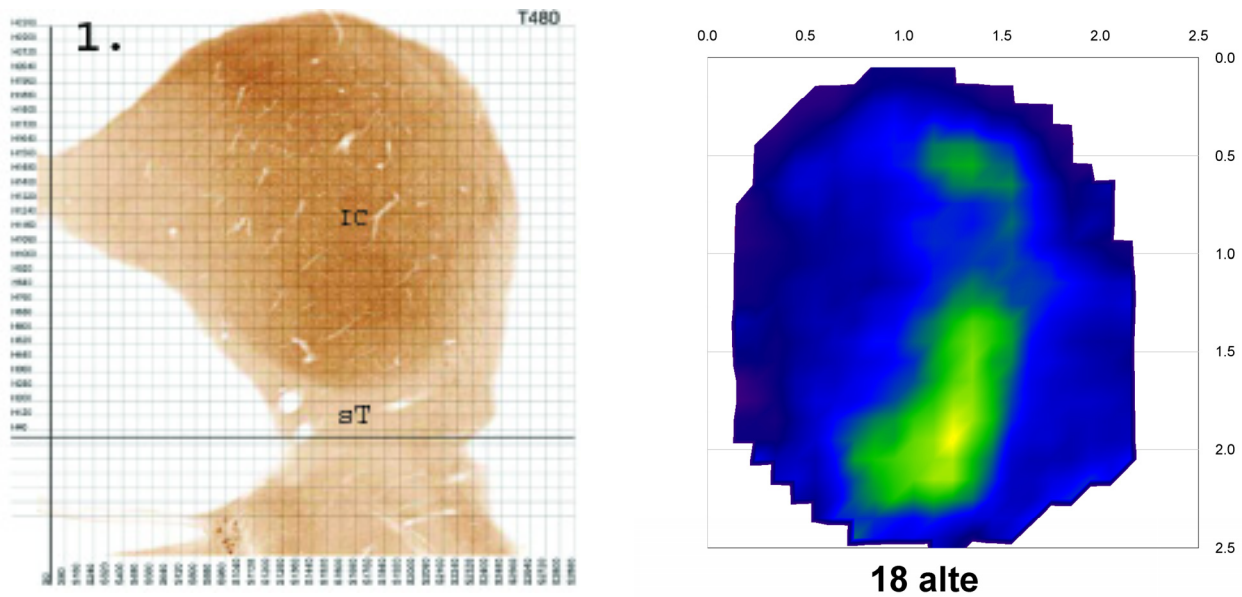


Abb. 4.2: Charakteristisches Muster der Cytochromoxidase-Expression und der Dichte inhibitorischer Neurone im Colliculus inferior.

Links: Transversale Atlasschnitte durch den IC des Gerbils, nach Reaktion mit Cytochromoxidase-Aktivität. Eine stärkere Braunfärbung entspricht einer höheren Cytochromoxidase-Aktivität (Abbildung entnommen aus Cant und Benson, 2005).

Rechts: lokale Dichte GABAerger Neurone (pro mm²) im IC alter Gerbils (N=18). Je mehr der Farbstich in Richtung hellgrün-gelb geht, desto höher die Zelldichte (vgl. Farbcodierung in Abb. 4.7.).

Ordnet man diese Befunde den anatomisch definierten Unterteilungen (wie beispielweise von Faye-Lund und Osen (1985) beschrieben) des IC zu, so wird deutlich, dass sich die höchste Dichte GABAerger Neurone im Bereich des zentralen Kerns (ICC) des IC befindet, der den Hauptteil der aufsteigenden auditorischen Projektionen erhält. Im externen und lateralen Cortex dagegen exprimieren sehr viel weniger Zellen GABA. Von Interesse ist in dieser Hinsicht auch die räumliche Anordnung von Neuronen in Bezug auf die von ihnen bearbeiteten Frequenzen, der sogenannten Tonotopie. Eine solch grundlegende Organisation in tonotope Karten konnte durch auditorische physiologische und experimentelle neuroanatomische Studien im zentralen Kern des IC sowohl bei Ratten (z.B. Huang und Fex, 1985) als auch bei Gerbils (z.B. Ryan et al., 2004) nachgewiesen werden. Merzenich und Reid (1974) zeigten eine in höchsten Maßen geordnete Repräsentation der Cochlea im zentralen Kern des IC von Katzen.

Lässt sich eine frequenzabhängige Verteilung, Größe oder Expression GABAerger Neurone im IC feststellen und kann man nun durch verschiedenartig vom Alter beeinflusste Merkmale GABAerger Neurone innerhalb der tonotopen Achse auf Beeinträchtigungen des Hörens in bestimmten Frequenzbereichen schließen?

Die Abbildungen 3.7, 3.27 und 4.2 weisen darauf hin, dass die Dichte GABAerger Zellen im ventralen Teil des IC höher als im dorsalen Teil ist. Für eine quantitative Analyse dorso-ventraler Gradienten wurde in dieser Arbeit ein lateral der Mitte gelegener dorso-ventraler Streifen des IC festgelegt, in dem die Zellen nicht nur gezählt, sondern auch zusätzlich detailliert vermessen wurden (Abb. 2.4b, 2.8a). Bezieht man die tonotope Gliederung des IC von dorsal niedrigen Frequenzen nach ventral hohen Frequenzen in die Betrachtungen der Zellverteilung mit ein, so fällt auf, dass die Dichte GABAerger Neurone bei jungen und alten Tieren im hochfrequenten Bereich am höchsten ist (Abb. 3.7, 3.27). Die Analyse der Zellquerschnittsflächen und der Grauwerte entlang der dorsoventralen Achse des IC zeigte eine geringe, aufgrund der hohen Anzahl analysierter Neurone sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren signifikante Zunahme der Zellquerschnittsfläche und eine Zunahme des Grauwerts (Abb. 3.17-3.21). Ventral gelegene hochfrequente Neurone weisen im Vergleich zu dorsal gelegenen tieffrequenten Neuronen im Mittel eine etwas größere Querschnittsfläche und eine geringere Expression von GABA auf. Die Daten gaben keine deutlichen Hinweise auf frequenzspezifische altersbedingte Unterschiede.

Auch in anderen Kerngebieten der Hörbahn wurde der Einfluss der Tonotopie auf die Größe der Neurone untersucht. So konnte wie in der vorliegenden Arbeit auch bei der MSO (mediale superiore Olive) gezeigt werden, dass die im dorsalen, tieffrequenten Bereich gelegenen Zellen signifikant kleiner waren als die in den medialen und ventralen hochfrequenten MSO-Abschnitten (Dalles, 2009). Ein solcher Trend existierte auch für die GABAergen Zellen des LNTB (lateral Kern des Trapezkörpers), jedoch waren die Unterschiede hier nicht signifikant. Auch die ebenfalls inhibitorischen glyzinergeren Zellen des LNTB waren im dorsalen Abschnitt signifikant kleiner als die ventral und medial gelegenen (Dalles, 2009). Im LNTB, der MSO und dem IC scheinen also die tieffrequenten Neurone eine geringere Querschnittsfläche aufzuweisen als die hochfrequenten. Im Gegensatz dazu steht der MNTB (mediale Kern des Trapezkörpers), bei dem tieffrequente Neurone große und hochfrequente kleine Querschnittsflächen zeigten (Pasic et al., 1994; Gleich und Strutz, 2002).

Die Beobachtung frequenzspezifischer Unterschiede der Eigenschaften GABAerger Neurone im IC legt nahe, dass der physiologische Prozess der Verarbeitung von Hörreizen im IC bei hohen und tiefen Frequenzen unterschiedlich verläuft.

Die altersabhängigen Veränderungen der Parameter innerhalb der tonopen Achse waren weniger eindeutig. So wies zwar ein Vergleich der Ergebnisse von jungen und alten Tieren darauf hin, dass die Querschnittsfläche der Neurone und die Expression von GABA bei alten Tieren eher im ventralen, also hochfrequenten Bereich des IC abnehmen (siehe Vergleich der Regressionslinien in Abb. 3.19 und 3.21), allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Unterschiede einer altersbedingten Beeinträchtigung des Hörens in bestimmten Frequenzbereichen konnten damit nicht erklärt werden.

4.5 Die Folgen uni- und bilateraler peripherer Hörschädigungen auf den GABA-Stoffwechsel in der zentralen Hörbahn - Rückschlüsse auf mögliche Auswirkungen altersbedingter Schwerhörigkeit auf den IC

Durch die blind erfolgten Messungen dieser Arbeit wurden unter anderem „unbewusst“ 9 Tiere mit untersucht, die pathologische Veränderungen im Gehörgang und im Mittelohr aufwiesen, durch die eine periphere Hörstörung verursacht wurde. Die Daten dieser Tiere sollen hier gesondert betrachtet werden. Es stellt sich die Frage, ob die vorliegenden peripheren Hörstörungen und somit eventuell fehlenden Eingänge akustischer Informationen in die zentrale Hörbahn Auswirkungen auf die Anzahl und Dichte GABAerger Neurone im IC haben.

Zunächst einmal ist es wichtig zu wiederholen, dass die Hörbahnfasern vor dem Erreichen des IC die Gehirnhälften kreuzen. Somit werden akustische Informationen, die beispielsweise im linken Ohr eingehen, überwiegend im IC der rechten Gehirnhälfte verarbeitet. Lag eine ipsilaterale Hörstörung vor, wurde also der IC untersucht, der die akustischen Informationen aus dem gesunden Ohr erhielt. Lag dagegen eine contralaterale Hörstörung vor, wurde genau der IC betrachtet, der einen geringeren Eingang an Reizen aus der Peripherie erhielt.

Die Ergebnisse zeigten Hinweise darauf, dass eine ipsilaterale Hörstörung zu einer Zunahme der Anzahl und Querschnittsfläche sowie der Dichte GABAerger Neurone im IC führt. Eine contralateral zum untersuchten IC gelegene Hörstörung scheint dagegen eher mit einer Abnahme der Anzahl GABAerger Neurone und damit deren Dichte sowie einer geringeren Expression von GABA einherzugehen (Abb. 3.27). Obwohl diese Ergebnisse

aufgrund der geringen Stichprobengröße und der fehlenden Kenntnis des zeitlichen Rahmens und des Grades der peripheren Hörstörung nicht überinterpretiert werden sollten, lassen sich doch vorsichtige Überlegungen formulieren und Rückschlüsse ziehen.

So könnte die bei ipsilateralen Hörstörungen beobachtete Zunahme des GABAergen Stoffwechsels möglicherweise eine Folge des verminderten Eingangs an Informationen des IC der gegenüberliegenden Gehirnhälfte und einer dadurch verursachten Asymmetrie exzitatorischer aufsteigender Hörreize sein. Durch eine kompensatorische Erhöhung des hemmenden Botenstoffs im ipsilateral der Hörstörung gelegenen IC würde dafür gesorgt werden, dass der Gehalt an weiterzuleitenden akustischen Informationen zu höher gelegenen Hirnstrukturen der anderen Gehirnhälfte angeglichen wird. Da der IC ein Integrationszentrum für aufsteigende mon- und binaurale Reize darstellt und die Geräuschquellenlokalisation von einer durch GABA vermittelten binauralen Hemmung abhängig ist (Faingold et al., 1989), könnten durch eine Anpassung des GABA-Stoffwechsels an den Informationsgehalt des gegenüberliegenden IC beispielsweise Defizite beim Richtungshören der betroffenen Tiere (zumindest teilweise) kompensiert worden sein.

Im Einklang damit steht die Beobachtung des Rückgangs GABAergen Stoffwechsels bei Hörstörungen im contralateralen Ohr. Es erscheint naheliegend, dass bei einem geringeren Eingang akustischer Informationen in den IC die Filter-Funktion von GABA als hemmender Transmitter für aufsteigende Reize in der Hörbahn weniger notwendig ist als bei einem gesunden peripheren Hörapparat. Auch bei der bilateralen Hörstörung zeigte sich eine deutlich verminderte Dichte GABAerger Neurone im IC, allerdings handelte es sich hierbei nur um ein betroffenes Tier, so dass man diesen Befund in keiner Weise verallgemeinern kann.

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Studie von Dong et al. (2010a) an Meerschweinchen, bei denen ein partialer unilateraler Verlust peripherer neuronaler Sensitivität im hochfrequenten Bereich der Cochlea verursacht wurde und nach immunhistochemischer Färbung die topographische Verbreitung von GABA-Rezeptoren (GABRA1) im IC untersucht wurde. Entsprechend den Befunden der vorliegenden Arbeit zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion der GABARA1-Markierungen in Regionen des contralateralen IC, in denen hochfrequente Tonstimuli verarbeitet werden. Auch konnte nachgewiesen werden, dass eingeschränktes peripheres Hören

einen Rückgang mit neuronaler Inhibition assoziierter Gene im contralateralen IC zur Folge hat (Dong et al., 2010b).

Eine weitere Studie wurde ebenfalls an Meerschweinchen mit partiellem peripherem Hörverlust durchgeführt und zeigte sowohl eine Reduktion der zur Synthese von GABA essentiellen Glutamat-Decarboxylase als auch der GABA- und Glyzin-Rezeptoren im ipsilateralen Nucleus Cochlearis, dem ersten Kern der aufsteigenden Hörbahn, bei dem die Fasern noch ungekreuzt verlaufen (Dong et al., 2009).

Ein partieller peripherer Hörverlust in diesen Beispielen führte also zu einer kompensatorischen Reduktion GABAerger Aktivität, die sowohl die Synthese von GABA (Glutamat-Decarboxylase) als auch GABA-Rezeptoren einschloss.

Im Gegensatz dazu berichten Suneja et al. (1998) bei Meerschweinchen über einen Beobachtungszeitraum von mehr als 4 Monaten von einem deutlichen, über die Beobachtungszeit abnehmenden, Anstieg der GABA-Freisetzung im contralateralen IC nach Entfernung der Gehörknöchelchen. Ein etwas geringerer Anstieg der GABA-Freisetzung im Vergleich zu Kontrollen konnte nach Entfernung der Cochlea verzeichnet werden. Keine Änderungen der GABA-Freisetzung wurden für den ipsilateralen IC gefunden. Die Aufnahme von GABA (als Maß für die Entfernung von GABA aus dem Extrazellularraum) war 0-5 Tage nach Unterbrechung der Gehörknöchelkette sowohl im ipsi-, als auch im contralateralen IC deutlich erhöht, während nach 4 Monaten die Aufnahme nur im contralateralen IC vermindert war. Nach einer Entfernung der Cochlea war sowohl im ipsi-, als auch im contralateralen IC nach 4 Monaten die GABA-Aufnahme reduziert.

Um diese von bisherigen Arbeiten stark abweichenden Ergebnisse besser einordnen zu können, soll im Folgenden kurz auf die von Suneja et al. (1998) angewandte Methodik eingegangen werden.

Dabei wurden zunächst die isolierten Gewebestücke des IC mit radioaktiv markiertem GABA exponiert. Danach wurden die Gewebe gewaschen. Durch eine elektrische Stimulation wurden die Neurone depolarisiert und zur Transmitterausschüttung „gezwungen“. Die dabei freigesetzte Radioaktivität galt dann als ein Maß für das aus den Synapsen ausgeschüttete GABA. Im Vergleich zur physiologischen in-vivo Situation ist dies eine sehr artifizielle Situation. So stellt sich z.B. die Frage, nach welchem Mechanismus die Anzahl GABAerger Neurone nach einer Hörstörung bei den immunhistochemischen Studien abnimmt. Die Zellen könnten absterben und somit

komplett verschwinden. Sie könnten aber auch lediglich die Produktion von GABA herunterregulieren und so in den Immunfärbungen nicht mehr als GABAerg erkennbar sein. Wenn die GABAerge Funktion infolge einer Hörstörung heruntergeregt wird, kann das dadurch erfolgen, dass das Enzym für die Herstellung von GABA [GAD] und gleichzeitig auch Rezeptoren von GABA herunterreguliert werden (siehe Dong et al., 2010). Somit ist auch vorstellbar, dass die Enzyme zur Inaktivierung bzw. Wiederaufnahme von GABA aus dem Extrazellularraum erhöht werden, um „störendes“ GABA zu eliminieren. Wenn dann so ein modifiziertes System radioaktivem GABA ausgesetzt wird, könnten sie dieses möglicherweise besonders effizient aufnehmen und dann entsprechend bei elektrischer Stimulation wieder abgeben, und dies in Mengen, die über denen der Kontrolltiere liegen.

Im Gegensatz zu Suneja et al., (1998) und im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, berichten Bledsoe et al. (1995) über eine deutlich reduzierte GABA-Freisetzung im IC von Ratten, die mit Neomycin ertaubt wurden. Auch der umfangreiche Review von Caspary et al. (2008) zu inhibitorischen Transmittern und Altern im zentralen auditorischen System bei Säugetieren kommt gleich in der Einleitung zu folgender Feststellung: „Aging and partial damage to the peripheral sensory systems of mammals appear to result in plastic pre- and postsynaptic changes in the inhibitory neurotransmitter systems of the primary sensory pathways.“ Diese Änderungen werden in der Schlussfolgerung dieser Arbeit folgendermaßen zusammengefasst: „Studies reviewed above suggest there is an age-related net downregulation of glycinergic and GABAergic inhibition throughout the auditory central nervous system.“ Vor diesem Hintergrund erscheint die Interpretation der Ergebnisse von Suneja et al. (1998) problematisch.

Die Befunde bisheriger Publikationen und der vorliegenden Arbeit deuten also insgesamt darauf hin, dass ein peripherer Hörverlust mit einer Herunterregulierung hemmender Neurotransmitter in den nachgeschalteten Kernen der zentralen Hörbahn einhergeht.

Ließen sich in weiteren Untersuchungen mit größeren Stichproben an hörgeschädigten Wüstenrennmäusen die oben beschriebenen Erkenntnisse untermauern, wäre dies ein weiterer Hinweis dafür, dass die Abnahme des GABAergen Stoffwechsels im IC, wie sie in der bisherigen Literatur beispielweise bei Ratten beschrieben wird, weniger dem

zentralen Alterungsprozess an sich, sondern vielmehr dem altersbedingten Verlust des peripheren Hörens der gewählten Versuchstiere zuzuschreiben ist.

5. Zusammenfassung

Altersschwerhörigkeit stellt ein Problem dar, das aufgrund des demographischen Wandels immer mehr Patienten über einen immer längeren Lebensabschnitt betrifft und dessen soziale und medizinische Relevanz daher mehr und mehr an Bedeutung gewinnt. Ursächlich können der Presbyakusis pathologische Veränderungen im peripheren Abschnitt (äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr) oder aber der zentralen Hörbahn zu Grunde liegen. Während die Therapie des peripheren Hörverlusts mittlerweile gut etabliert ist, sind Maßnahmen, die auf die Ursachen des zentralen Hörverlusts abzielen, dagegen noch kaum entwickelt. Für die Patientengruppe, die unter einer rein zentralen Hörstörung leidet und für diejenigen, die trotz scheinbar gut angepasstem Hörgerät nur eine unzureichende Besserung ihres Hörproblems erfahren, gilt es neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

Genauere Kenntnisse über die im Alter ablaufenden Veränderungen der zentralen Verarbeitung akustischer Signale und die dabei entscheidenden strukturellen und funktionellen Pathomechanismen müssen dafür gewonnen werden. Daten, die in den zurückliegenden zwei Dekaden erhoben wurden, weisen darauf hin, dass es im Alter zu einer Abnahme der GABAergen Funktion in der zentralen Hörbahn kommt, in der der Colliculus inferior die größte auditorische Struktur darstellt und eine bedeutende Rolle spielt. Eine wichtige Frage ist, inwieweit die Veränderungen in der zentralen Hörbahn unabhängig von oder in Kombination mit bzw. als Folge einer peripheren Hörstörung auftreten. Bisherige Untersuchungen wurden überwiegend an Ratten durchgeführt, die im Alter deutliche periphere Hörverluste aufweisen.

In der vorliegenden Studie wurden als Versuchstiere Mongolische Wüstenrennmäuse verwendet, die sensitiv im Frequenzbereich der menschlichen Sprache sind und auch im fortgeschrittenen Alter nur einen relativ geringen peripheren Hörverlust aufweisen. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Analyse des Colliculus inferior (IC) der Wüstenrennmaus, um dabei rein „zentral“ bedingte altersbedingte Veränderungen aufzuzeigen.

Dafür wurden jeweils ein frontaler Gehirnschnitt durch den rechten oder linken IC von 7 jungen (unter einem Jahr) und 18 alten Tiere (3-5 Jahre) mit unauffälligen Mittelohrstatus und von 9 Tieren mit einem beeinträchtigten peripheren Hörvermögen in einer blind angelegten Studie immunhistologisch untersucht. Neben der

Querschnittsfläche des IC wurde die Anzahl GABAerger Neurone und deren lokale Dichte im gesamten IC-Querschnitt sowie die Querschnittsfläche und der Grauwert (Färbeintensität) der Neurone in einem 500µm breiten Bereich des lateralen IC bestimmt.

Die Querschnittsfläche des IC nahm bei alten Wüstenrennmäusen signifikant ab. Dies deutet auf eine mit dem Alter einhergehende Schrumpfung des Colliculus inferior bei Wüstenrennmäusen hin und erscheint kongruent zu Daten, die an einzelnen anderen Kernen der zentralen Hörbahn erhoben wurden. Hierbei scheint es sich nicht um eine globale Schrumpfung des Gehirns zu handeln, sondern um sehr spezifische Veränderungen in den einzelnen auditorischen Kernen, die mit einer Abnahme der Innervationsdichte und/oder einem Verlust von Neuronen einher gehen.

Die Verteilung GABAerger Neurone innerhalb des gesamten IC-Querschnitts zeigte ein bei jungen und alten Tieren ähnliches charakteristisches Muster mit der höchsten Dichte im Bereich des zentralen Kerns, was in Übereinstimmung mit bisherigen Studien steht. Entlang der tonotop gegliederten dorsoventralen Achse des IC konnte gezeigt werden, dass ventral gelegene hochfrequente Neurone im Vergleich zu dorsal gelegenen tief-frequenten Neuronen im Mittel eine etwas größere Querschnittsfläche und eine geringere Expression von GABA aufweisen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der physiologische Prozess der Verarbeitung von Hörreizen im IC bei hohen und tiefen Frequenzen unterschiedlich verläuft. Die Daten gaben dagegen keine deutlichen Hinweise auf frequenzspezifische altersbedingte Unterschiede. Die in hohen und tiefen Lagen häufig unterschiedliche Beeinträchtigung des Hörens im Alter konnte somit nicht erklärt werden.

Auch eine altersbedingte Abnahme von Indikatoren für die Funktion des GABAergen Systems (Anzahl, Größe und Färbeintensität GABAerger Neurone) im IC wurde im Gegensatz zu bisher bei Ratten beschriebenen Effekten nicht bestätigt. Eine Erklärung hierfür könnte der erhebliche periphere Hörverlust alternder Ratten sein, der durch den reduzierten Eingang akustischer Informationen in die Hörbahn möglicherweise für die in bisheriger Literatur beschriebene altersbedingte Reduktion der GABA-Expression im IC verantwortlich ist.

Die Untersuchung der 9 Wüstenrennmäuse mit ipsi-, contra- oder bilateral beeinträchtigten peripheren Hörvermögen stützen diese Annahme, da der hier reduzierte akustische Input in den IC auch bei der Wüstenrennmaus zu einer Reduktion

der Expression von GABA führte. Zukünftige Studien mit größeren Stichproben hörgeschädigter Wüstenrennmäuse könnten weitere Hinweise dafür liefern, dass sich diese für die Untersuchung der rein zentral bedingten Altersschwerhörigkeit möglicherweise besser eignen als Ratten.

Insgesamt konnte durch die vorliegende Studie gezeigt werden, dass der IC von Wüstenrennmäusen bis auf die Größenabnahme des Gesamtquerschnitts im Gegensatz zu Daten von Ratten weitgehend resistent gegenüber altersbedingten Veränderungen ist. Mögliche Einflüsse peripherer ipsi- und contralateraler Hörstörungen auf GABAerge Neurone im IC wurden aufgezeigt und geben den Anreiz für weitere diesbezügliche Untersuchungen in der Zukunft. Die unterschiedliche Eignung von Wüstenrennmäusen und Ratten für die Erforschung von Pathomechanismen der Altersschwerhörigkeit konnte herausgearbeitet werden.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, J.C. (1979): Ascending projections to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 183: 519-538.
- ADAMS, J.C. (1980): Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci. Lett.* 19: 1-5.
- AITKIN, L.M., PHILLIPS, S.C. (1984): Is the inferior Colliculus an obligatory relay in the cat auditory system? *Neurosci. Lett.* 44: 259-264.
- ARNESSEN, A.R. (1982): Presbycusis-loss of neurons in human cochlear nuclei. *Journal of Laryngology and Otology* 96: 503-511
- BANAY-SCHWARTZ, M., LAJTHA, A., PALKOVITS, M. (1989): Changes within aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related acids. *Neurochem. Res.* 14: 555-562.
- BIALER, M., JOHANNESSEN, S.I., KUPFERBERG, H.J., LEVY, R.H., PERUCCA, E., TOMSON, T. (2007): Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII) Review article *Epilepsy Res.*, Vol. 73: (1)1-52.
- BIELEFELD, E.C., COLING, D., CHEN, G.D., LI, M., TANAKA, C., HU, B.H., HENDERSON, D. (2008): Age-related hearing loss in the Fischer 344/NHsd rat substrain. *Hear. Res.* 241: 26-33.
- BLEDSON, S.C. Jr, NAGASE, S., MILLER, J.M., ALTSCHULER, R.A. (1995): Deafness-induced plasticity in the mature central auditory system. *Neuroreport* 7: 225-229.
- CANT, N.B., BENSON, C.G. (2005): An atlas of the inferior colliculus of the gerbils in three dimensions. *Hear. Res.* 206: 12-27.
- CASPARY, D.M., RAZA, A., LAWHORN ARMOUR, B.A., PIPPIN, J., ARNERIC, S.P. (1990): Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: Implications for neural presbycusis. *J. Neurosci.* 10(7): 2363-2372.

- CASPARY, D.M., MILBRANDT, J.C., HELFERT, R.H. (1995): Central auditory aging: GABA changes in the inferior colliculus. *Experimental Gerontology* 30: 349-360.
- CASPARY, D.M., LING, L., TURNER, J.G., HUGHES, L.F. (2008): Review: Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J. of Experimental Biology* 211: 1781-1791.
- CHAMPOUX, F., PAIEMENT, P., MERCIER, C., LEPORE, F., LASSONDE, M., GAGNÉ, J.P. (2007): Auditory processing in a patient with a unilateral lesion of the inferior colliculus. *Eur. J. Neurosci.* 25(1): 291-297.
- CREMER, R., ZEEF, E.J. (1987): What kind of noise increases with age? *Journal of Gerontology* 42: 515-518.
- DALLES, C. (2009): Der laterale Kern des Trapezkörpers (LNTB) und die mediale obere Olive (MSO): Altersbedingte Veränderungen bei der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). Universitätsbibliothek Regensburg.
- DONG, S., MULDER, W.H., RODGER, J., ROBERTSON, D. (2009): Changes in neuronal activity and gene expression in guinea-pig auditory brainstem after unilateral partial hearing loss. *Neuroscience*, 159(3): 1164-74.
- DONG, S., RODGER, J., MULDER, W.H., ROBERTSON, D. (2010a): Tonotopic changes in GABA receptor expression in guinea pig inferior colliculus after partial unilateral hearing loss. *Brain Res.* 1342: 24-32.
- DONG, S., MULDER, W.H., RODGER, J., WOO, S., ROBERTSON, D. (2010): Acoustic trauma evokes hyperactivity and changes in gene expression in guinea-pig auditory brainstem. *Eur. J. Neurosci.* 31(9), 1616-28.
- DURHAM, D., ADAMS, J., CANT, N., COTANCHE, D., OLIVER, D., WU, D. (1999): Anatomical methods for research in otolaryngology- A short course presentation of the association for research in otolaryngology.
- FAINGOLD, C.L., GEHLBACH, G., CASPARY, D.M. (1989): On the role of GABA as an inhibitory neurotransmitter in inferior colliculus neurons: Ionophoretic studies. *Brain Res.* 500: 302-312.

- FAY, R. (1988): Hearing in Vertebrates: A Psychophysics Databook. Hill-Fay Associated, Winnetka, Illinois.
- FAYE-LUND, H., OSEN, K.K. (1985): Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol (Berl)* 171(1): 1-20.
- FRISINA, D.R., FRISINA, R.D. (1997): Speech recognition in noise and presbycusis: relations to possible neural mechanisms. *Hear. Res.* 106: 95-104.
- GLEICH, O., STRUTZ, J. (2002): A quantitative comparison of the Medial Nucleus of the Trapezoid Body (MNTB) in young and old Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Hear. Res.* 164: 166-178.
- GLEICH, O., HAMANN, I., KLUMP, G.M., KITTEL, M., STRUTZ, J. (2003): Boosting GABA improves impaired auditory temporal resolution in the gerbil. *Neuroreport* 14, 1877-1880.
- GLEICH, O., WEISS, M., STRUTZ, J. (2004): Age-dependent changes in the lateral superior olive (LSO) of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Hear. Res.* 194:
- GLEICH, O. (2006): Altersbedingte Veränderungen auditorischer Hirnstammkerne (bei Nagetieren): Beeinträchtigen Defizite des inhibitorischen Systems die Verarbeitung komplexer Schallsignale? 9. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Audiologie, Abstract DGA 2006.
- GLEICH, O. (2007): Altersbedingte zentrale Hörstörungen und funktionelle Veränderungen der aufsteigenden Hörbahn. In: Hören im Alter, 13. Multidisziplinäres Kolloquium der GEERS-Stiftung, Band 16 (Hrsg.: SPECHT, H.v.), Gustav Kleff GmbH&Co. KG, Dortmund, 57-76.
- GLEICH, O., BÖHMIG, J., STRUTZ, J. (2008): Charakterisierung der Verteilung GABAerger Neurone im Colliculus inferior der Wüstenrennmaus. Poster auf der 79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. Universität Bonn.
- GUNDERSEN, H.J.G., JENSEN, E.B. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147: 229-263.

- GUTIERREZ, A., KHAN, Z.U., MORRIS, S.J., DE BLAS, A.L. (1994): Age-related decrease of GABAA receptor subunits and glutamic acid decarboxylase in the rat inferior colliculus. *J. Neurosci.* 14: 7469-7477.
- HAMANN, I., GLEICH, O., KLUMP, G.M., KITTEL, M.C., BOETTCHER, F.A., SCHMIEDT, R.A., STRUTZ, J. (2002): Behavioral and evoked-potential thresholds in young and old Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Hear. Res.* 171: 82-95.
- HANSEN, C.C., RESKE-NIELSEN, E. (1965): Pathological studies in presbycusis. *Arch. Otolaryngol.* 82: 115-132.
- HELFERT, R.H., SOMMER, T.J., MEEKS, J., HOFSTETTER, P., HUGHES, L.F. (1999): Age-related synaptic changes in the central nucleus of the inferior colliculus of Fischer-344 rats. *J. Comp. Neurol.* 406: 285-298.
- HEMMING, K., MAGUIRE, M.J., HUTTON, J.L., MARSON, A.G. (2008): Vigabatrin for refractory partial epilepsy. *Cochrane Database Syst. Rev.*(3): CD007302.
- HESSE, G., LAUBERT, A. (2005): Hörminderung im Alter: Ausprägung und Lokalisation. *Deutsches Ärzteblatt* Jg.102 H. 41,A 2864-2869.
- HUANG, C.M., FEX, J. (1985): Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat demonstrated with the 2-deoxyglucose method. *Exp. Brain Res.* 61(3): 506-512.
- KEITHLEY, E.M., RYAN, A.F., FELDMAN, M.L. (1992): Cochlear degeneration in aged rats of four strains. *Hear. Res.* 59: 171-178.
- KIRIKAE, L., SATO, T., SHITARA, T. (1964): A Study of hearing in advanced age. *Laryngoscope* 74: 205-220.
- KUWADA, S., YIN, T.C.T., HABERLY, L.B., WICKESBERG, R.E. (1980): Binaural interaction in the cat inferior colliculus: Physiology and Anatomie. In: *Psychophysical, Physiological and Behavioural Studies in Hearing*, VAN DEN BRINK, G., BILSEN, F.A., 401-411, Delft University Press.
- LANGE, S., BENDER, R. (2007): (Lineare) Regression/Korrelation. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132: e9-e11.

- MANN, H.B., WHITNEY, D.R. (1947): On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* 18 (1): 50-60.
- MAZUREK, B., STÖVER, T., HAUPT, H., GROSS, J., SZCZEPEK, A. (2008): Die Entstehung und Behandlung der Presbyakusis. *HNO, Springer Berlin/Heidelberg* 56, 429-435.
- MC GEER, E.G., MC GEER, P.L. (1975): Age changes in the human for some enzymes associated with metabolism of catecholamines, GABA and acetylcholine. *Neurobiology of Aging Plenum Press, New York*, 287-305.
- MERZENICH, M.M., REID, M.D. (1974): Representation of the cochlea within the inferior colliculus of the cat. *Brain res.* 77: 397-415.
- MILBRANDT, J.C., ALBIN, R.L., CASPARY, D.M. (1994): Age-related decrease in GABA_B receptor binding in the Fischer 344 rat inferior colliculus. *Neurobiol. Aging* 15: 699-703.
- MILNE-EDWARDS, M. (1867): Observations sur quelques mammifères du nord de la chine. *Annales de Science naturelle* 5, Paris, 375-377.
- OLIVER, D.L. (2005): Neuronal Organisation in the Inferior Colliculus. In: WINER, J.A., SCHREINER, C.E. (Hrsg.): *The inferior colliculus. Springer-Verlag Berlin*, 69-114.
- OUDA, L., DRUGA, R., SYKA, J. (2008): Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. *Experimental Gerontology* 43: 782-789.
- PASIC, T.R., MOORE, D.R., RUBEL, E.W. (1994): Effects of altered neuronal activity on cell size in the medial nucleus of the trapezoid body and ventral cochlear nucleus of the gerbil. *J.Comp. Neurol.* 348: 111-120.
- POLOMBI, P.S., CASPARY, D.M. (1996): GABA inputs control discharge rate primarily within frequency receptive fields of inferior colliculus neurons. *J. Neurophysiol.* 75: 2211-2219.
- PALOMBI, P.S., CASPARY, D.M. (1996a): Physiology of the young adult Fischer 344 rat inferior colliculus: responses to contralateral monaural stimuli. *Hear. Res.* 100: 41-58.

- PALOMBI, P.S., CASPARY, D.M. (1996b): Physiology of the aged Fischer 344 rat inferior colliculus: responses to contralateral monaural stimuli. *J. Neurophysiol.* 76: 3114-3125.
- RICH, S.T. (1968): The Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) in research. *Laboratory animal care* 18(2): 235-237.
- RYAN, A.F. (1976): Hearing sensitivity of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Acoust. Soc. Am.* 59: 1222-1226.
- RYAN, A.F., FURLOW, Z., WOOLF, N.K., KEITHLEY, E.M. (1988): The spatial representation of frequency in the rat dorsal cochlear nucleus and inferior colliculus. *Hear. Res.* 36:181-189.
- RYAN, A.F., WOOLF, N.K., SHARP, F.R. (2004): Tonotopic organization in the central auditory pathway of the mongolian gerbil: A 2-deoxyglucose study. *J. Comp. Neurol.* 207(4): 369-380.
- SCHUKNECHT, M.D., HAROLD, F. (1964): Further Observations on the Pathology of Presbycusis. *Arch. Otolaryngol.* 80(4): 369-382.
- SINNOTT, J.M., STREET, S.L., MOSTELLER, K.M., WILLIAMSON, T.L. (1997): Behavioral measures of vowel sensitivity in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*): Effects of age and genetic origin. *Hear. Res.* 112: 235-246.
- SOHN, W. (2000): Aktueller Stand der Schwerhörigkeit in Deutschland. - Ergebnisse einer repräsentativen Hörscreening-Studie (erstellt durch die Universität Witten-Herdecke im Auftrage der Siemens SAT), Vortrag/Pressegespräch: Zusammenfassg.: Hörakustik 3/2000, 6.
- SOHN, W. (2001): Schwerhörigkeit in Deutschland - Repräsentative Hörscreening-Untersuchung bei 2000 Probanden in 11 Allgemeinpraxen, *Z. Allg. Med.* 77: 143-147.
- STEHLE, K. (2010): Altersbedingte Veränderungen des inhibitorischen Systems im Nucleus Cochlearis der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones Unguiculatus*). Universitätsbibliothek Regensburg.

- STRUTZ, J. (1991): Die nicht tumorbedingten zentralen Hörstörungen- Eine Übersicht. HNO 39: 332-338.
- STUERMER, I.W., PLOTZ, K., LEYBOLD, A., ZINKE, O., KALBERLAH, O., SAMJAA, R., SCHEICH, H. (2003): Intraspecific Allometric Comparison of Laboratory Gerbils with Mongolian Gerbils Trapped in the Wild Indicates Domestication in *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867) (Rodentia: Gerbillinae). Zoologischer Anzeiger 242: 249-266.
- SUNEJA, S.K., POTASHNER, S.J., BENSON, C.G. (1998): Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral middle ear ossicle removal and cochlear ablation. Exp. Neurol. 151(2): 273-288.
- SYKA, J. (2010): The Fischer 344 rat as a model of presbycusis. Hear. Res. 264: 70-78.
- TARNOWSKI, B.I., SCHMIEDT, R.A., HELLSTROM, L.I., LEE, F.S., ADAMS, J.C. (1991). Age related changes in cochleas of Mongolian gerbils. Hear. Res. 54: 124-134.
- URQUIZA, R., RICO, F., FIGUEROLA, J.A. (1988): The Gerbil (*Meriones unguiculatus*) in auditory research. Acta Otorrinolaringol. Esp. 39(4): 227-233.
- VATER, M., HABBICHT, H., KÖSSEL, M., GROTHE, B. (1992): The functional role from GABA and glycine in monaural and binaural processing in the inferior colliculus of horseshoe bats. J. Comp. Physiol. A 171: 541-553.
- WEBSTER, D.B. (1992): An Overview of Mammalian Auditory Pathways with an Emphasis on Humans. In: WEBSTER, D.B., POPPER, N.A., FAY, R.R.: The mammalian auditory Pathway: Neuroanatomy. Springer Verlag, 1-23.
- WEIß, C., BAUER, A. (2008): Promotion. Die medizinische Doktorarbeit –von der Themensuche bis zur Dissertation. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 92-98.
- YULE, G.U. (1897): On the theory of correlation. J. Roy. Statist. Soc. 60: 812-854.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Gerbils sortiert nach der Altersgruppe bzw. Hörstörung. Angabe von Tiernummer, Alter in Tagen und Alter in Monaten. In den letzten Zeilen sind die jeweiligen Mittelwerte aufgeführt.			
Altersgruppe/Hörstörung 1=junge Tiere 2=normal hörende alte Tiere 3=Tiere mit ipsilateraler Hörstörung 4=Tiere mit contralater Hörstörung 5=Tier mit bilateraler Hörstörung	Tiernummer	Alter (Tage)	Alter (Monate)
1	673	84	2,8
1	680	40	1,3
1	698	28	0,9
1	710	224	7,4
1	711	224	7,4
1	718	112	3,7
1	838	243	8,0
2	702	1095	36,0
2	724	1095	36,0
2	759	1207	39,7
2	763	1307	43,0
2	764	1125	37,0
2	773	1643	54,0
2	782	1734	57,0
2	784	1156	38,0
2	785	1308	43,0
2	787	1432	42,2
2	793	1217	40,0
2	795	1399	46,0
2	805	1156	38,0
2	808	1156	38,0
2	811	1795	59,0
2	819	1247	41,0
2	822	1308	43,0
2	827	1460	48,0
3	783	1278	42,0
3	788	1323	43,6
3	791	956	31,5
3	792	1199	39,5
3	809	1582	52,0
3	810	1612	53,0
4	712	1132	37,2
4	820	1209	39,9
5	705	449	14,8
Mittelwerte	Normal jung		4,5
	Normal alt		43,3
	Ipsilaterale Hörstörung		43,6
	Contralaterale Hörstörung		38,6

Anhang

Tabelle 2

Übersicht über die Messwerte jedes ausgewerteten IC-Schnitts. Die linke Säule zeigt die Altersgruppe des Tieres (1=jung, 2=alt, 3=einzelnes Tier mit dazwischen liegender Anzahl von Monaten). Die folgenden Säulen zeigen die Tiernummer und den jeweils untersuchten IC (links oder rechts), die ermittelte Anzahl GABAerger Zellen und die Zelldichte (Zellen/mm²). In den letzten Zeilen sind die jeweiligen Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen aufgeführt.

Altersgruppe	Tiernummer	Zellzahl	Zelldichte (Zellen/mm ²)
1	673.re	125	29,76
1	680.li	152	37,72
1	698.re	127	38,60
1	710.li	130	33,08
1	711.re	132	40,87
1	718.li	141	41,35
1	838.li	205	63,47
2	702.li	108	36,24
2	724.li	147	47,12
2	759.li	158	56,43
2	763.li	99	32,35
2	764.re	85	26,65
2	773.re	141	43,79
2	782.re	128	55,90
2	784.re	226	73,14
2	785.re	181	63,51
2	787.re	168	48,55
2	793.re	234	75,73
2	795.li	190	64,19
2	805.re	244	69,71
2	808.li	186	53,76
2	811.li	242	68,56
2	819.li	160	54,98
2	822.re	137	39,48
2	827.li	157	43,61
2	783.re	266	71,89
2	788.re	161	46,80
2	791.re	100	30,86
2	792.li	174	63,04
2	809.re	169	54,34
2	810.re	235	88,35
2	712.re	94	26,55
2	820.li	113	40,21
3	705.re	94	30,72
Mittelwerte	Normal jung	144,6	40,69
	Normal alt	166,2	52,98
	Ipsilaterale Hörstörung	184,2	59,2
	Contralaterale Hörstörung	103,5	33,4

Tabelle 3

Übersicht über die Messwerte jedes ausgewerteten IC-Schnitts. Die linke Säule zeigt die Altersgruppe des Tieres (1=jung, 2=alt, 3=einzelnes Tier mit dazwischen liegender Anzahl von Monaten). Die folgenden Säulen zeigen die Tiernummer und den jeweils untersuchten IC (links oder rechts), die Breite des IC (mm), die Höhe des IC (mm) und die Anzahl der Gitternetzpunkte innerhalb der Rohdaten (ein Maß für die Fläche). In den letzten Zeilen sind die jeweiligen Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen aufgeführt.

Altersgruppe	Tier	Breite (mm)	Höhe (mm)	Anzahl der Gitternetzpunkte
1	673.re	2,2	2,6	420
1	680.li	2,3	2,6	403
1	698.re	2,2	2,1	329
1	710.li	2,1	2,6	393
1	711.re	2	2,2	323
1	718.li	2	2,4	341
1	838.li	1,9	2,3	323
2	702.li	2,1	2,2	298
2	724.li	2,1	2,2	312
2	759.li	1,9	2,2	280
2	763.li	2	2,3	306
2	764.re	2	2,3	319
2	773.re	2,1	2,1	322
2	782.re	1,7	1,9	229
2	784.re	2	2,2	309
2	785.re	1,8	2,4	285
2	787.re	2	2,6	346
2	793.re	2	2,1	309
2	795.li	2	2,2	296
2	805.re	2,1	2,2	350
2	808.li	2,1	2,4	346
2	811.li	2	2,5	353
2	819.li	2	2	291
2	822.re	2	2,4	347
2	827.li	2,1	2,3	360
2	783.re	2	2,5	370
2	788.re	2,1	2,4	344
2	791.re	2	2,1	324
2	792.li	1,7	2	276
2	809.re	1,9	2,3	311
2	810.re	1,8	2,1	266
2	712.re	2	2,5	354
2	820.li	1,9	2,1	281
3	705.re	1,9	2,3	306
Mittelwerte	Normal jung	2,1	2,4	361,7
	Normal alt	2,0	2,3	314,3
	Ipsilaterale Hörstörung	1,9	2,2	315,2
	Contralaterale Hörstörung	2,0	2,3	317,5

Tabelle 4

Übersicht über die Messwerte jedes ausgewerteten IC-Schnitts. Die linke Säule zeigt die Altersgruppe des Tieres (1=jung, 2=alt, 3=einzelnes Tier mit dazwischen liegender Anzahl von Monaten). Die folgenden Säulen zeigen die Tiernummer und den jeweils untersuchten IC (links oder rechts), die Summe aller Mess-Quadrate (mm^2), die Summe detailliert ausgewerteter Mess-Quadrate und den Anteil der detailliert analysierten Zellen. In den letzten Zeilen sind die jeweiligen Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen aufgeführt.

Altersgruppe	Tiernummer	Summe aller Mess-Quadrate (mm^2)	Summe detailliert ausgewerteter Mess-Quadrate	Anteil detailliert analysierter Zellen
1	673.re	4,67	1,25	0,352
1	680.li	4,51	1,27	0,44736842
1	698.re	3,71	1,05	0,49606299
1	710.li	4,42	1,18	0,49230769
1	711.re	3,64	1,08	0,40909091
1	718.li	3,84	1,10	0,40425532
1	838.li	3,64	1,09	0,51219512
2	702.li	3,39	0,99	0,44444444
2	724.li	3,54	1,03	0,37414966
2	759.li	3,21	0,96	0,37974684
2	763.li	3,48	1,08	0,53535354
2	764.re	3,61	1,10	0,52941176
2	773.re	3,63	1,04	0,36170213
2	782.re	2,64	0,92	0,578125
2	784.re	3,5	1,05	0,36725664
2	785.re	3,26	1,03	0,35359116
2	787.re	3,92	1,17	0,3452381
2	793.re	3,49	1,03	0,35470085
2	795.li	3,37	1,03	0,35789474
2	805.re	3,94	1,01	0,31967213
2	808.li	3,9	1,03	0,3172043
2	811.li	3,97	1,15	0,31818182
2	819.li	3,3	0,99	0,51875
2	822.re	3,9	1,16	0,39416058
2	827.li	4,03	1,13	0,43949045
2	783.re	4,14	1,20	0,34586466
2	788.re	3,88	1,06	0,42857143
2	791.re	3,66	1,03	0,37
2	792.li	3,14	0,94	0,51724138
2	809.re	3,52	1,08	0,40828402
2	810.re	3,04	1,00	0,42553191
2	712.re	3,98	1,12	0,5
2	820.li	3,2	0,96	0,43362832
3	705.re	3,47	1,06	0,4787234
Mittelwerte	Normal jung	4,06	1,15	0,44
	Normal alt	3,56	1,05	0,40
	Ipsilaterale Hörstörung	3,56	1,05	0,42
	Contralaterale Hörstörung	3,59	1,04	0,47

Tabelle 5

Übersicht über die Messwerte aus dem detailliert untersuchten Bereich des IC. Die linke Säule zeigt die Tiernummer und den jeweils untersuchten IC (links oder rechts). Die folgenden Säulen zeigen die Anzahl der ausgewerteten Zellen und die mittlere Zellfläche (μm^2). In den letzten Zeilen sind die jeweiligen Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen aufgeführt.

Tiernummer	Anzahl ausgewerteter Zellen	Zellgröße (Fläche in μm^2)
673.re	44	147,739077
680.li	68	128,181223
698.re	63	150,1961
710.li	64	151,212135
711.re	54	127,079043
718.li	57	150,84947
838.li	105	217,186263
702.li	48	125,18859
724.li	55	113,122125
759.li	60	157,281631
763.li	53	155,578945
764.re	45	143,687286
773.re	51	155,150591
782.re	74	150,684297
784.re	83	134,217365
785.re	64	142,145573
787.re	58	140,524754
793.re	83	157,977364
795.li	68	143,164537
805.re	78	131,382679
808.li	59	149,784264
811.li	77	160,389771
819.li	83	143,421411
822.re	54	140,474898
827.li	69	145,852284
783.re	92	161,199652
788.re	69	196,959278
791.re	37	158,140493
792.li	90	144,783495
809.re	69	156,223022
810.re	100	160,856491
712.re	47	172,363964
820.li	49	139,044542
705.re	45	146,697124
Mittelwert junge Tiere	65	153,206187
Mittelwert alte Tiere	64,56	143,890465
Mittelwert Tiere mit Hörstörung ipsilateral	76,17	163,027072
Mittelwert Tiere mit Hörstörung contralateral	48	155,704253

Tabelle 6

Übersicht über verschiedene Aspekte der Zelldichte im IC. Die linke Säule zeigt die Tiernummer und den jeweils untersuchten IC (links oder rechts). Die nächste Säule zeigt die Altersgruppe (1= jung, 2= alt) bzw. bei den hörgeschädigten Tieren die Seite und Art der Hörschädigung. Die folgenden Säulen zeigen den Flächenanteil des IC mit einer Dichte GABAerger Neurone von über 40.7 in Prozent und in mm².

Tier	Altersgruppe bzw. Seite der Hörschädigung	Flächenanteil mit Dichte über 40.7 (%)	Flächenanteil mit Dichte über 40.7 (mm²)
673.re	1	23,1263383	0,97130621
680.li	1	33,924612	1,36716186
698.re	1	38,8140162	1,27698113
710.li	1	27,8280543	1,09364253
711.re	1	35,7142857	1,15357143
718.li	1	41,1458333	1,40307292
838.li	1	62,0879121	2,00543956
702.li	2	34,5132743	1,02849558
724.li	2	47,4576271	1,48067797
759.li	2	49,0616622	1,37372654
763.li	2	26,4367816	0,80896552
764.re	2	21,3296399	0,68041551
773.re	2	42,6997245	1,37493113
782.re	2	53,7878788	1,23174242
784.re	2	69,7142857	2,15417143
785.re	2	65,9509202	1,87960123
787.re	2	47,1938776	1,63290816
793.re	2	82,52149	2,54991404
795.li	2	62,3145401	1,84451039
805.re	2	81,9407008	2,86792453
808.li	2	60,5128205	2,09374359
811.li	2	76,070529	2,68528967
819.li	2	49,0909091	1,42854545
822.re	2	35,520362	1,23255656
827.li	2	43,4243176	1,56327543
783.re	Mittelohrentzündung Re	70,0483092	2,59178744
788.re	Mittelohrentzündung Re	47,9381443	1,64907216
791.re	Mittelohrentzündung Re	24,4186047	0,79116279
792.li	Mittelohrentzündung Li	36,8644068	1,01745763
809.re	Mittelohrentzündung Re	54,8295455	1,70519886
810.re	Mittelohrentzündung Re	78,2894737	2,0825
712.re	Cholesteatom Li	18,5929648	0,65819095
820.li	Mittelohrentzündung Re	35,3125	0,99228125
705.re	Gehörgänge verstopft, Mittelohr und Innenohr erscheinen normal	25,3602305	0,77602305

Tabelle 7

Vergleich der ermittelten Zahlen GABAerger Neurone bei der 1. und 2. Zellzählung im detailliert analysierten Bereich. Die linke Säule zeigt die Nummer des untersuchten Tieres.

Tier	Anzahl GABAerger Neurone bei 1. Zellzählung (im Rahmen der Zählung im gesamten IC)	Anzahl GABAerger Neurone bei 2. Zellzählung (im Rahmen der Zellvermessung im detailliert untersuchten Bereich)
673	46	44
680	69	68
698	55	63
702	38	48
705	39	45
710	67	64
711	51	54
712	45	47
718	55	57
724	62	55
759	60	60
763	51	53
764	39	45
773	51	51
782	73	74
783	92	92
784	94	84
785	70	64
787	57	58
788	68	69
791	37	37
792	87	90
793	84	83
795	74	68
805	76	78
808	52	59
809	65	69
810	113	100
811	84	77
819	79	83
820	45	49
822	50	54
827	63	69
838	107	105

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
AVCN	Anteroventraler Kern des Nucleus cochlearis
CAP	Amplitude der Aktionspotentiale
CN	Nucleus cochlearis
DAB	Diaminobenzidin-Lösung
DC	Dorsaler Cortex des IC
DCN	Dorsaler Kern des Nucleus cochlearis
GABA	γ -Amino-Buttersäure
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IC	Colliculus inferior
ICC	Zentraler Kern des IC
IPSP	Inhibitorische Postsynaptische Signale
LC	Lateraler Kern des IC
LNTB	Lateraler Kern des Trapezkörpers
LSO	Laterale superiore Olive
MNTB	Medialer Kern des Trapezkörpers
MSO	Mediale superiore Olive
MWU	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
OAE	Otoakustische Emissionen
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffer mit NaCl
PBST	PBS mit Triton
PVCN	Posteroventraler Kern des Nucleus cochlearis
ROI	Region Of Interest
SC	Colliculus superior
sT	Subcolliculares Tegmentum
TIF	Tagged Image Files

7.3 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. J. Strutz möchte ich mich für die Möglichkeit zur Promotion an seinem Lehrstuhl bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. O. Gleich, der diese Arbeit wunderbar betreut hat, mir zu jedem Zeitpunkt mit seinem ausführlichem Rat zur Seite stand und dessen bemerkenswerter Sachverstand und konstruktive Kritik außerordentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau U. Schreiter und Frau C. Woegerbauer danke ich für die histologische Aufarbeitung der Gehirne.

Zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie. Für die Unterstützung während des Studiums und die Besuche in Regensburg, die mir immer wieder freie Zeit für die Fertigstellung dieser Arbeit gewährt haben, möchte ich mich insbesondere bei meinen Eltern und auch bei meiner Schwiegermutter bedanken. Meinem Sohn Josua danke ich für sein sonniges und unkompliziertes Gemüt und meinem Mann Nils für jegliche Rückenstärkung in all den gemeinsamen Jahren.